

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**BIOLOGÍA DE LOS MEGACARIOCITOS EMBRIONARIOS:
VÍAS DE DIFERENCIACIÓN Y SU PAPEL EN EL
ESTABLECIMIENTO DE LOS COMPARTIMENTOS
CELULARES DEL HÍGADO FETAL**

TESIS DOCTORAL

**NATALIA SERRANO AMARILLA
MADRID, 2010**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**BIOLOGÍA DE LOS MEGACARIOCITOS EMBRIONARIOS:
VÍAS DE DIFERENCIACIÓN Y SU PAPEL EN EL
ESTABLECIMIENTO DE LOS COMPARTIMENTOS
CELULARES DEL HÍGADO FETAL**

Memoria presentada por
Natalia Serrano Amarilla
para optar al grado de Doctor en Ciencias

Dirigida por la Dra. **M^a Luisa Gaspar Alonso-Vega y Miguel A. Rodríguez Marcos**
Unidad de Inmunobiología. Centro Nacional de Microbiología
INSTITUTO DE SALUD CARLOS III

Madrid, 2010

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Salud Carlos III y en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC), con ayuda de los proyectos N° SAF-2003-08194-C02, N° SAF-2007-65262-C02, ambos del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Deseo expresar mi gratitud al Centro de salud Carlos III, por la concesión de una Beca y Contrato Intramural (2005-2009), a la Fundación Severo Ochoa (2009) y al CBMSO (2010) por un contrato.

***A la memoria de
Miguel A. R. Marcos***

“No existen preguntas sin respuestas, sólo preguntas mal formuladas”
(Matrix)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IV
ABREVIATURAS	VI
SUMMARY	IX
INTRODUCCIÓN	1
• 1.- CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS: DEFINICIÓN, MODELOS DE DIFERENCIACIÓN, PLASTICIDAD Y TRANSDIFERENCIACIÓN	2
• 2.- DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA Y MEGACARIOCITOPOYESIS	3
2.1.- De las HSC a progenitores de megacariocitos: Posibles vías de diferenciación	3
2.2.- Progenitores megacariocíticos comprometidos	4
2.3.- Cambios morfológicos celulares durante la diferenciación megacariocítica	5
2.4.- Tipos celulares específicos en la megacariocitopoyesis según su morfología	6
2.5.- Patrón de expresión de glicoproteínas de membrana, integrinas y receptores durante la maduración megacariocítica	7
• 3.- REGULACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS	8
3.1.- Factores de transcripción	8
3.2.- Citoquinas y otros factores de regulación molecular de la megacariocitopoyesis	9
3.3.- Generación de plaquetas	10
3.4.- Nicho celular de la megacariocitopoyesis	11
• 4.- HEMATOPOYESIS Y MEGACARIOCITOPOYESIS EMBRIO/FETAL	12
4.1.- Nichos primarios y generación de HSC en el embrión	12
4.2.- Hematopoyesis primitiva y definitiva	13
4.3.- Eritropoyesis y megacariocitopoyesis	15
4.4.- El hígado como órgano hematopoyético fetal	16
• 5.- DESARROLLO DEL HÍGADO	17
5.1.- Competencia, especificación y fases tempranas de su morfogénesis	17
5.2.- Estructura del hígado adulto	19
• 6.- INFLUENCIAS HEPATO-EPITELIALES Y HEMATOPOYÉTICOS-MEGACARIOCÍTICOS EN LA MORFOGÉNESIS Y REPARACIÓN TISULAR	19
6.1.- Influencias durante las etapas iniciales del desarrollo hepático	19
6.2.- Papel de las plaquetas en hemostasis y en reparación tisular	20
OBJETIVOS	21

MATERIAL Y MÉTODOS	22
• 1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	22
• 2.- OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES A PARTIR DE DIFERENTES ÓRGANOS DEL EMBRIÓN DE RATÓN	22
• 3.- INMUNOFENOTIPADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	23
a) Anticuerpos monoclonales, policlonales, reactivos secundarios y otros reactivos	23
b) Tinción de subpoblaciones celulares con anticuerpos monoclonales	23
• 4.- PURIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES	23
• 5.- CULTIVOS CELULARES	25
a) Medios de cultivo	25
b) Soportes de cultivo	25
c) Condiciones de cultivo	26
d) Ensayos de formación de colonias hematopoyéticas <i>in vitro</i> (CFU-C)	26
• 6.- TINCIONES HISTOLÓGICAS, INMUNOFUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA	27
a) Preparación de las muestras	27
b) Tinción Hematoxilina-Eosina	27
c) Tinción May-Gründwald Giemsa	28
d) Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica	28
e) Ensayos de proliferación celulares	29
• 7.- DETECCIÓN DE TRÁNSCRITOS ESPECÍFICOS POR PCR Y PCR A TIEMPO REAL	30
• 8.- PROGRAMAS DE ANÁLISIS UTILIZADOS	32
RESULTADOS	34
• 1.- LA POBLACIÓN PROGENITORA DE CÉLULAS HEPÁTICAS Y COLANGIOCITOS c-Kit ^D CD45 ⁻ Ter119 ⁻ , PRESENTE EN EL HÍGADO FETAL A E11.5 DE GESTACIÓN, ES HETEROGÉNEA Y CONTIENE PROGENITORES DEL LINAJE MEGACARIOCÍTICO (pMKs)	34
• 2.- PRESENCIA DE PROGENITORES DE MEGACARIOCITOS EN NICHOS HEMATOPOYÉTICOS EMBRIONARIOS	37
• 3.- DIFERENCIACIÓN DE pMKs EN EL HÍGADO A E11.5	39
• 4.- LOS pMKs PRESENTES EN EL HÍGADO A E11.5 EXHIBEN UNA EXPRESIÓN ANÓMALA DE PROTEÍNAS HEPATO-EPITELIALES Y ENDOTELIALES	43
• 5.- LOS pMKs DE E11.5 DIFERENCIAN ESPONTÁNEAMENTE <i>IN VITRO</i> Y EMITEN PROPLAQUETAS	46
• 6.- LOS MKs SON UNA POBLACIÓN ABUNDANTE EN EL HÍGADO EMERGENTE	49
• 7.- LOS MKs EMBRIONARIOS HEPÁTICOS EMITEN PROPLAQUETAS <i>IN VIVO</i>	51
• 8.- NICHOS DE MEGACARIOPOYESIS EN EL HÍGADO DEL EMBRIÓN EN DESARROLLO	52
8.1.- Los MKs se encuentran asociados al nicho vascular	53

8.2.- Las células hematopoyéticas CD45 ⁺ no se asocian con MKs	55
8.3.- Zonas preferenciales de maduración eritroide en el hígado	56
• 9.- RELACIÓN ENTRE pMKs Y PROGENITORES HEPATO-EPITELIALES (pHep)	59
9.1.- Los pMKs del hígado a E11.5 son necesarios para el desarrollo <i>in vitro</i> de capas hepato-epiteliales	59
9.2.- Relación entre células del componente hepato-epitelial y los pMKs <i>in vivo</i>	61
• 10.- PROGENITORES INMADUROS Y PROLIFERACIÓN HEPÁTICA DURANTE LA MORFOGÉNESIS	63
10.1.- Concentración preferencial de células progenitoras en la periferia hepática	63
10.2.- Proliferación diferencial de células hematopoyéticas en el hígado fetal a E11.5	65
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES	82
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXO I: MATERIAL SUPLEMENTARIO	101

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura I-1.- Esquema de diferenciación hematopoyética	4
Figura I-2.- Esquema de la diferenciación megacariocítica	8
Figura I-3.- Nichos de hematopoyesis en el embrión de ratón	14
Figura I-4.- Visión esquemática del proceso de morfogénesis hepática	18
Figura MM-1.- Proceso de microdissección para la obtención de las muestras embrionarias	23
Tabla MM-1.- Anticuerpos monoclonales, policlonales, secundarios y otros reactivos utilizados ...	24
Tabla MM-2.- Secuencias de oligonucleóticos utilizados como cebadores en las PCRs, tamaños (pares de bases; pb), temperaturas de hibridación ($T^{\circ}H$) y referencias bibliográficas de cada gen amplificado	32
Figura R-1.- Análisis por CT de suspensiones celulares de FL de ratón a E11.5	35
Figura R-2.- Evolución de las poblaciones $CD49f^{H}c-Kit^{D}$ y $CD49f^{D}c-Kit^{D}$ durante la gestación	35
Figura R-3.- Fenotipaje de la población embrionaria $CD49f^{H}c-Kit^{D}$	36
Figura R-4.- Análisis de la expresión de las moléculas de integrinas en la población $CD45^{-}CD41^{++}$ a E11.5	37
Tabla R-1.- Resumen de las subunidades α y β de la familia de las integrinas, los heterodímeros que forman, los ligandos y la función que realizan	37
Figura R-5.- Caracterización por CT de la población pMK presente en diferentes localizaciones en E10.5 y E11.5, en suspensiones celulares de YS, PBL, AGM y FL	38
Tabla R-2.- Valores de MFI \pm SEM (n=5) obtenidos con los Acs indicados, sobre la población $CD45^{-}CD41^{++}$ en las distintas localizaciones hematopoyéticas a E11.5	39
Figura R-6.- Diferenciación <i>in vitro</i> de las poblaciones celulares $CD45^{++}KDR^{-}$ y $CD45^{+}KDR^{-}$	40
Figura R-7.- Diferenciación <i>in vitro</i> de las poblaciones celulares $CD45^{+}KDR^{+}$ y $CD45^{-}KDR^{+}$	41
Figura R-8.- Morfologías adoptadas por la población $CD45^{+}KDR^{+}$ en cultivo	42
Figura R-9.- Diferenciación <i>in vitro</i> de las poblaciones $CD45^{++}KDR^{-}$ y $CD45^{+}KDR^{-}$	43
Figura R-10.- Análisis del potencial de diferenciación de las células de YS y FL	43
Figura R-11.- Caracterización fenotípica <i>ex vivo</i> de células hepáticas $CD49f^{H}$ a E11.5	44
Figura R-12.- Expresión <i>ex vivo</i> de nestina y ALB en células $CD49f^{H}$ y $CD49f^{D}$	45
Figura R-13.- Expresión de genes específicos de MKs, células endoteliales, de filamentos intermedios y de células del linaje hepato-epitelial	46
Figura R-14.- Cinéticas del desarrollo <i>in vitro</i> de proPTs en cultivos a corto plazo de células purificadas pMKs $CD49f^{H}$	48
Figura R-15.- Patrón de expresión de CD41, actina-F, ALB y nestina a las 48 horas en cultivos de células purificadas $CD49f^{H}$	49
Figura R-16.- Localización <i>in vivo</i> de pMKs en el embrión a E11.5	50

Figura R-17.- Caracterización morfológica de las células CD41 ⁺ <i>in vivo</i> : Presencia de proPTs	52
Figura R-18.- pMKs en relación al nicho vascular	54
Figura R-19.- Localización de células CD45 ⁺ y F4/80 ⁺ en el hígado a E11.5	55
Figura R-20.- El hígado fetal es el principal órgano de maduración eritroide	57
Figura R-21.- Fenotipo de las células aisladas de PBL y de la circulación intrahepática por CT a E11.5 y E12.5	58
Figura R-22.- Interacciones entre pMKs y pHep en FL11.5	60
Figura R-23.- Localización <i>in vivo</i> de las células ALB ⁺	62
Figura R-24.- Expresión de ALB <i>in vivo</i> E11.5-E15.5	62
Figura R-25.- Detección de los progenitores c-Kit ⁺ en el embrión a E11.5-E15.5	64
Tabla R-3.- Porcentaje de células de las diferentes subpoblaciones hepáticas a E11.5 en el FL, obtenido a través de CT e inmunofluorescencia, así como el diámetro celular, el porcentaje de células CD41 ⁺ que establece contactos con otros tipos de células y la proliferación celular	64
Figura R-26.- Patrón de proliferación <i>in vivo</i> de células en el hígado a E11.5	65
Figura D-1.- Vías de diferenciación del linaje megacariocítico en el FL a E11.5	70
Figura D-2.- Esquema de las relaciones establecidas entre el componente vascular, el hepato-epitelial y los MKs en el FL11.5	78
Figura D-3.- Vista esquemática y modelo de organización celular propuesto en el FL a E11.5	79

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AAT	Alfa-1-antitripsina.
Ac	Anticuerpo.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
AFP	Alfa feto-proteína.
Ag	Antígeno.
AGM	Aorta-gónadas-mesonefros.
ALB	Albúmina.
APC	Alofocianina.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	ARN mensajero.
BFU-MK	Unidades formadoras de megacarioblastos (<i>Burst forming units-megakaryocytes</i>).
BM	Médula ósea (<i>Bone marrow</i>).
BMECs	Células endoteliales de médula ósea (<i>Bone marrow endothelial cells</i>).
BMPs	Proteínas morfogenéticas óseas (<i>Bone morphogenetic proteins</i>).
CFU	Unidades formadoras de colonias (<i>Colony forming units</i>).
CFU-GM	CFU granulocito-monocito.
CK	Citoqueratina.
CLP	Progenitor común linfoide (<i>Common lymphoid progenitor</i>).
CMP	Progenitor común mieloide (<i>Common myeloid progenitor</i>).
COL	Colágeno.
CT	Citometría de flujo.
DMS	Sistema de demarcación de membranas (<i>Demarcation membrane system</i>).
E	Edad gestacional.
EdU	5-ethynyl-2-prime-deoxyuridine.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>).
EPO	Eritropoyetina (<i>Erythropoietin</i>).
Ery	Eritrocito / Eritroide.
ESC	Célula tronco embrionaria (<i>Embryonic Stem Cell</i>).
FACS	Citometría de flujo preparativa (<i>Fluorescence activated cell sorter</i>).
FBS	Suero fetal de ternera (<i>Fetal bovine serum</i>).
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>).
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico (<i>Fibroblast growth factor</i>).
FL	Hígado fetal (<i>Fetal Liver</i>).

GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green fluorescence protein</i>).
GGT	Gamma-glutamyl transferasa.
HE	Hematoxilina-Eosina.
HGF	Factor de crecimiento hepático (<i>Hepatocyte growth factor</i>).
Hi	Hígado adulto.
HSC	Célula tronco hematopoyética (<i>Hematopoietic Stem Cell</i>).
IL	Interleuquina.
KO	Mutante de delección (<i>Knockout</i>)
LN	Laminina.
LMPP	Progenitores linfomieloides.
MG	Megacarioblastos.
MEP	Progenitor común megacariocito-eritroide (<i>Megakaryocyte-erythrocyte progenitor</i>).
MFI	Intensidad media de fluorescencia (<i>Mean fluorescence intensity</i>).
MK	Megacariocito.
MPPs	Progenitores multipotenciales.
NES	Nestina.
pb	Pares de bases.
PBL	Linfocitos de sangre periférica (<i>Peripheral blood lymphocytes</i>).
PBS	Tampón fosfato sódico (<i>Phosphate-buffered saline</i>).
PBT	PBS 1x + 0,1% Tween-20.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase chain reaction</i>).
PCR-TR	PCR a tiempo real.
pEry	Progenitores eritroides.
PF4	Factor plaquetario 4.
PF4%	Paraformaldehído 4%.
pHep	Progenitores hepato-epiteliales.
pMK	Progenitores megacariocíticos.
proMG	Promegacarioblasto.
proPTs	Proplaquetas.
P-Sp	Esplachnopleura paraórtica.
PTs	Plaquetas.
R	Región.
Ri	Riñón adulto.
rpm	Revoluciones por minuto.
SB	Solución de bloqueo.

SC	Célula tronco (<i>Stem Cell</i>).
SCF	Factor de células madre (<i>Stem Cell Factor</i>).
SEM	Error estándar de la media.
ST	Solución de tinción (<i>Staining Solution</i>).
TAT	Tirosin amino transferasa.
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta (<i>Transforming growth factor beta</i>).
TPO	Trombopoyetina.
TTR	Transtiretina.
VIM	Vimentina.
vWF	Factor de von Willebrand (<i>Von Willebrand Factor</i>).
WL	Células fusiformes tipo “gusano” (<i>Worm-like cells</i>).
YS	Saco vitelino (<i>Yolk Sac</i>).

SUMMARY

SUMMARY

In response to signals derived from the cardiac mesoderm and the septum transversum, the liver is specified as an endodermal gut evagination intermixed with mesodermal cells, including new vessels. Between E9.5 and E10.5, hematopoietic progenitors home to the organ, where they rapidly expand up to represent the major fetal reservoir of hematopoietic cells. Bipotential hepatoblasts isolated in the emerging E10.5 liver, greatly grow during the following gestational days. Among blood cells, CD41⁺CD42c⁺ megakaryocytes (MKs) represent a tiny population in the adult bone marrow (BM; 1/10,000 cells), but at E11.5 they are highly concentrated in the embryo liver (5-8%). Similar to adult MKs, E11.5 pMKs are defined by the expression of CD41⁺⁺CD42c⁺KDR⁺CD9⁺CD31⁺, but they display differential features from those found in the adult BM, as are a low polyploidy and absence of CD45 and CXCR4 expression, while they display several hepato-specific transcripts.

pMKs are already found at E10.5 and in other embryo hematopoietic niches, as are the YS, P-Sp/AGM and PBL. FL pMKs appear to be more immature than those found in other simultaneous embryo locations, since they maintain c-Kit and CD105 expression, and bear lower levels of CD41 and CD42c. Other cell populations (CD45⁺KDR⁻CD41⁻ and CD45⁺⁺KDR⁻CD41⁻) present in the FL at E11.5 contain megakaryocytic progenitors able to carry on rapid *in vitro* differentiation to MKs. In both cases, the cells generated in these cultures are initially CD45⁺CD41⁺CD42c⁺ and finally CD45⁻CD41⁺⁺CD42c⁺; probably mirroring the *in vivo* differentiation processes towards MK cells. Independently of thrombopoietin stimulation, fetal liver MKs CD41⁺⁺CD42c⁺KDR⁺CD9⁺CD31⁺ spontaneously develop *in vitro* different types of cytoplasmic processes such as long proplatelets and microparticles.

In situ, MKs lay in selected niches in the E11.5 embryo liver, surrounding both great vessels and small sinusoids, and in a band close to liver periphery, which also harbours CD45⁺F4/80⁺ myeloid cells and erythroid cells, located under the Glisson's capsule. When E11-liver cell populations, enriched in bipotential hepatoblasts (c-Kit^DCD49f^Dc-Met⁺CD45⁻Ter119⁻ cells), were purified and established *in vitro*, they neither survive nor differentiate in the absence of liver MKs. *In vitro* experiments performed in different conditions have demonstrated that direct cell to cell contacts between both purified populations of liver MKs and hepatoblasts, are required to optimally promote and increase the expression of the hepatic differentiation program in these later ones, as defined by the formation of hepatoepithelial layers and by the albumin transcript level. Only a partial effect could be induced by the addition of soluble factors (VEGF-A) to the cultures. As has been observed in adult liver regeneration, MKs may play a relevant role in promotion of liver development.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los organismos multicelulares se estructuran en compartimentos (órganos, tejidos) en los que las células se “profesionalizan” en tareas específicas a expensas de perder su autonomía. Estos compartimentos se definen tras la gastrulación embrionaria (establecimiento de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo, ectodermo), y en ellos coexisten diferentes linajes celulares, compuestos a su vez por células en variados estadios de diferenciación. Dentro de cada órgano, tanto durante el desarrollo como en la situación de homeostasis del adulto, se mantienen equilibrios internos que, soportados por un conjunto conservado y reducido de señales intercelulares, se utilizan de forma redundante. Estas señales modulan la actividad de factores de transcripción, que controlan los programas de expresión genética que acompañan a la diferenciación celular. Uno de los aparatos cuyos procesos de desarrollo y diferenciación han sido mejor estudiados es el sistema linfohematopoyético, en parte, por la accesibilidad de sus móviles componentes celulares y porque, sometidos a un constante recambio, obligan a la existencia de dinámicas poblaciones de progenitores en diferenciación continua, así como por el desarrollo temprano de potentes tecnologías cuantitativas de análisis. Más recientemente, la noción de la relevancia de los nichos microambientales en el sostén de progenitores hematopoyéticos y como condicionantes de su diferenciación, ha reforzado el interés de comprender la arquitectura topográfica de los órganos hematopoyéticos.

Durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis emerge como una especificación del mesodermo indiferenciado, en estrecho contacto con el desarrollo vascular, y de forma multicéntrica, en el saco vitelino (YS), la espachnopleura paraaórtica (P-Sp) y quizás la placenta, en diferentes períodos de la gestación y, al parecer, resultando en diferentes linajes celulares según el sitio de origen (Godin *et al.*, 1993; Weissman *et al.*, 1978). El hígado fetal (FL) deviene a partir de E11.5 el repositorio más importante de progenitores hematopoyéticos durante toda la gestación de los mamíferos, en paralelo a la propia maduración funcional de sus constituyentes de origen endodérmico, que abocarán a los hepatocitos y colangiocitos, que conforman el órgano central del metabolismo en el adulto. Ambos aspectos somáticos, las células sanguíneas y los precursores epiteliales, conviven y se influyen mutuamente durante el desarrollo, aunque los datos disponibles al respecto son limitados. Por otra parte, existe una amplia información sobre las bases genéticas y moleculares que condicionan el establecimiento y evolución de la mayor parte de los linajes celulares hematopoyéticos, en particular, de las células linfoides o eritroides (Ery), aunque son menos los datos disponibles sobre la biología de otros tipos celulares, como son los megacariocitos (MKs), eosinófilos, mastocitos, etc (Arinobu *et al.*, 2009). Los primeros son células muy escasas en la médula ósea (BM) adulta (1/10.000 células totales) cuyo interés más importante ha radicado siempre en sus derivados, las plaquetas (PTs), como los elementos celulares centrales

de la coagulación. Sin embargo, existen diversas informaciones sobre su papel (o el de sus derivados) en procesos como la regulación de la angiogénesis, regeneración tisular, etc. Comparten muchos aspectos moleculares y respuestas funcionales con las más primitivas células tronco (SC) multipotenciales y, al mismo tiempo, programas de diferenciación comunes con el linaje Ery y, quizás, progenitores bipotenciales comunes. Existen datos escasos sobre la aparición de los primeros MKs embrionarios, tanto en la hematopoyesis primitiva como en la definitiva, así como sus precursores y sitios de ubicación.

Estudios anteriores de nuestro laboratorio habían caracterizado poblaciones de progenitores bipotenciales hepáticos a día 11.5 de la gestación (E11.5, E, edad gestacional), con capacidad para reconstituir hepatocitos y células biliares en organoides de FL. En el curso de estos experimentos, se objetivó una población, fenotípicamente definida y cuantitativamente relevante, de células que promovía la diferenciación de dichos precursores hepáticos. Un estudio más sistemático y focalizado de este tipo celular nos ha permitido definirla como los primeros MKs embrionarios, que se concentran selectivamente en el FL durante una ventana ontogénica temprana (E10.5-E13.5) y que participan de forma prioritaria en el desarrollo del hígado, además de expresar de forma espontánea familias genéticas previamente restringidas a precursores hepáticos. Y éste es el sujeto central de este trabajo que opta al título de Tesis Doctoral.

1.- CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS: DEFINICIÓN, MODELOS DE DIFERENCIACIÓN, PLASTICIDAD Y TRANSDIFERENCIACIÓN

El sistema hematopoyético experimenta altísimas tasas de recambio de sus componentes, lo que obliga a preservar un conjunto de progenitores inmaduros capaces de regenerar las pérdidas celulares a lo largo de toda la vida del individuo. Las células capaces de dar lugar a cualquier célula de estirpe hematopoyética son denominadas como células tronco hematopoyéticas ("hematopoietic stem cells", HSC, Till y Mc, 1961). Para mantener la homeostasis celular y responder a las demandas del individuo, las SC llevan a cabo dos tipos de divisiones: a) División simétrica, por la que a partir de una célula se generan dos células hijas idénticas. Este tipo de división permite incrementar el número de SC y ocurre fundamentalmente durante el desarrollo, o durante la regeneración tisular en el adulto; b) División asimétrica, por la que una SC genera una célula hija con su mismo potencial hematopoyético, y otra que dará lugar a una progenie de células más diferenciadas. El potencial de autorrenovación ("self-renewal") que define las SC del adulto, está fundamentado en este último tipo de divisiones. Los mecanismos que dirigen las divisiones asimétricas en las SC pueden ser: **(1) Intrínsecos**, basados en la segregación irregular en la mitosis de algunos componentes celulares que determinan el destino celular, y **(2) Extrínsecos**, que dependen de señales extracelulares diferenciales, como consecuencia de la migración de las células hijas a distintos nichos (Marciniak-Czochra *et al.*, 2009). Se sabe que en la BM, la biología,

supervivencia y diferenciación de las HSC dependen de interacciones celulares (p. ej con células osteoblásticas N-cadherina positivas que tapizan la trabécula ósea) y de señales de factores solubles producidos *in situ* en determinados nichos. Así, la ubicación preferencial de las HSC junto al endosteo en la BM y en interacción estrecha con osteoblastos ha sido bien caracterizada, aunque existen evidencias de un nicho alternativo en áreas periendoteliales (Kiel y Morrison, 2006).

2.- DIFERENCIACIÓN HEMATOPOYÉTICA Y MEGACARIOCITOPOYESIS

2.1.- *De las HSC a Progenitores de Megacariocitos: Posibles Vías de Diferenciación*

La secuencia de diferenciación hematopoyética se inicia, por convención, en las denominadas LT-HSC (del inglés “long-term”), que expresan potencial de autorrenovación a largo plazo, pues cuando son trasplantadas en ratones inmunodeficientes o mielosuprimidos son capaces de llevar a cabo una reconstitución eficiente de todos los linajes hematopoyéticos durante más de seis meses, así como de recipientes secundarios y terciarios. Las ST-HSC (“short-term HSC”), son progeñie de las anteriores, y se identifican por su capacidad de reconstituir todos los linajes hematopoyéticos por un período limitado de tiempo (<6 semanas post-transferencia), lo que implica un potencial de autorrenovación restringido. De las ST-HSC, y dependiendo de los modelos propuestos, derivan los llamados progenitores multipotenciales (MPP), que carecen de potencial de autorrenovación pero pueden generar todos los linajes hematopoyéticos. Clásicamente, las HSC se han identificado como aquellas células que no expresan marcadores específicos de linajes (CD19, CD11b, CD4, CD8, GR-1, Ter-119, etc.; Lin⁻) y son positivas para las moléculas c-Kit (CD117), receptor tirosina-quinasa de membrana para el Stem cell Factor (SCF), y Sca-1/Ly6A/E, denominándose como células KSL (de Kit⁺, Sca⁺, Lin⁻) (Ema *et al.*, 2005). La expresión de la sialomucina CD34 define unas células KSL CD34⁻, entre las que se concentran las LT-HSC, y otros progenitores más maduros KSL CD34⁺ (ST-HSC y MPP). Otras características, como son el potencial de excluir el fluorocromo Hoechst 33342 a través de moléculas transportadoras de membrana asociadas a multi-resistencia a drogas (lo que permite definir la llamada “side population”), o la expresión de la endoglina (CD105, receptor accesorio del factor de crecimiento transformante beta, TGF-β), la integrina αIIb (CD41) o el receptor tipo 2 del Factor de crecimiento vasculo-endotelial (KDR, VEGFR-2 o FLK-1), han contribuido a la definición y obtención de poblaciones altamente enriquecidas en HSC (Coulombel, 2004).

A partir del tronco común de progenitores MPP, y desde un punto de vista de “parentesco” genético y funcional, cabría definir (Figura I-1) una familia mieloide (Ery, MKs, granulocitos, monocitos, eosinófilos, etc.) *versus* otra linfoide (células B, células T, NK, algunas células dendríticas, etc), cada una surgiendo de un progenitor oligopotencial específico, que son los llamados progenitor mielocítico común (CMP) y linfocítico común (CLP), respectivamente (Akashi *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1997). Dichos progenitores han sido bien definidos a nivel clonal *in vitro*, por

la expresión diferencial de los receptores del factor estimulador de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF-R) y de la interleuquina (IL) 7 (CD127 o IL-7R). Los análisis *in vivo* respecto a la existencia de CMP y CLP como tipos celulares discretos son menos concluyentes. Hay que considerar que muchos experimentos *in vitro* someten a los progenitores a estímulos excesivos que no recapitulan la fisiología celular, y en los que es difícil distinguir entre lo que es posible, lo probable y lo que realmente ocurre en el individuo. Esto, unido al problema que surge al intentar definir la mayor o menor relación de los MKs y las células Ery con el compartimento mieloide, ha llevado a postular modelos alternativos de hematopoyesis (Figura I-1). Así, la disección fina de los progenitores hematopoyéticos más inmaduros favorece un modelo en el que los potenciales de generación de linajes celulares específicos se van separando secuencialmente de un tronco común; en este caso la pérdida del potencial MK/Ery representaría la primera ramificación, inmediatamente después de las HSC, con quienes comparten múltiples aspectos moleculares y

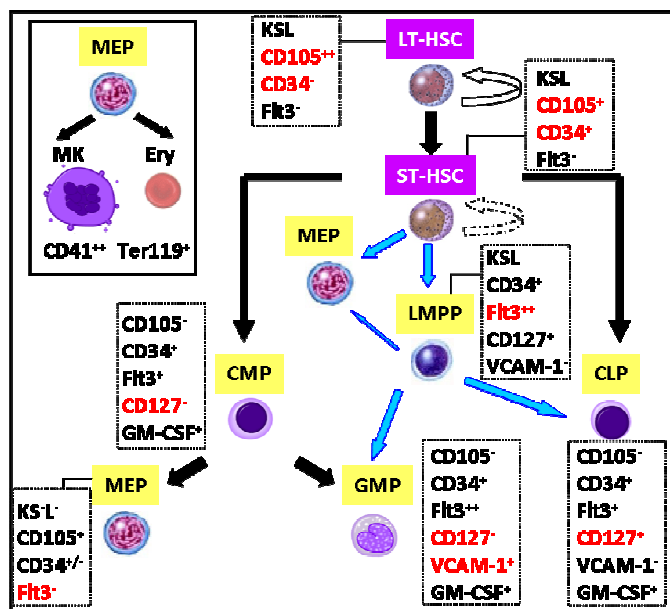


Figura I-1.- Esquema de diferenciación hematopoyética, en el que se incluyen el modelo clásico descrito por Weissman y cols. (Flechas negras) y el modelo alternativo propuesto por Jacobsen y cols. (Flechas azules). Se indican los progenitores pluripotenciales y multilineaje y sus principales características fenotípicas. En el recuadro de la izquierda aparecen destacados los linajes MK y Ery.

mantienen el potencial MK/Ery. De la misma forma, en ratones PU.1/GFP solo una fracción residual de progenitores KSL Flt3⁺GFP(PU.1)^{low}c-Mpl⁺⁺, mantiene un potencial MK/Ery (Arinobu *et al.*, 2007).

2.2- Progenitores Megacariocíticos Comprometidos

El consenso actual propone la existencia de un progenitor común para MKs y Ery (MEP, “megakaryocyte-erythroid progenitor”), en parte debido a la dependencia de ambos tipos celulares de la actividad de idénticos factores de transcripción, la co-expresión de receptores para

funcionales (Huang y Cantor, 2009).

La expresión del receptor Flt3/Flk2 (*fms-like tyrosine kinase-3/fetal liver kinase-2*) dentro de la población de progenitores hematopoyéticos KSL CD34⁺ permite diferenciar unos progenitores multipotenciales más inmaduros CD34⁺Flt3⁻ y otros precusores linfomieloides CD34⁺Flt3⁺, que ya han perdido la capacidad para generar MKs y Ery (Adolfsson *et al.*, 2005) excepto en

una pequeña fracción de células (2-3%) que expresan c-Mpl (receptor de trombopoyetina, TPO) a altos niveles y que

eritropoyetina (EPO) y TPO, las respuestas especulares de ambos linajes al mismo estímulo (vg., promoción de la diferenciación eritroide y supresión de MK por EKLF) y, sobre todo, a ensayos en condiciones clonales. Sin embargo, más allá de correlaciones plausibles entre ambos linajes en cultivos específicos, que pueden sesgar los destinos celulares de los progenitores iniciales, no existe una demostración formal de dicho precursor bipotencial (Forsberg *et al.*, 2006; Vannucchi *et al.*, 2000). Este MEP (c-Kit⁺ Sca-1⁻ Lin⁻ CD34^{+/+} Flt3⁻), expresaría genes esenciales para el compromiso y la diferenciación/desarrollo hacia los linajes megacariocíticos y eritrocíticos, como son GATA-1, el receptor de eritropoyetina (EpoR), c-Mpl, el factor de von Willebrand (vWF), SCL/TAL-1, FOG-1 (Friend of GATA), y NF-E2 (Chang *et al.*, 2002; Mikkola *et al.*, 2003; Orkin *et al.*, 1998; Shivdasani y Orkin, 1996; Zhu y Emerson, 2002).

En BM adulta, el inicio del linaje megacariocítico comienza con un progenitor unipotencial (pMK) c-Kit⁺ Sca-1⁻ CD127⁻ Thy1.1⁻ Lin⁻ que expresa la tetraspanina CD9, y que únicamente diferencia hacia MKs (Nakorn *et al.*, 2003). A partir de éste, la clasificación jerárquica del linaje se realiza en base a la capacidad de los progenitores comprometidos para proliferar *in vitro* y producir colonias en medios semisólidos (según el número de focos y de células/colonia). De esta forma, se identifican dos tipos de precursores megacariocíticos: progenitores formadores de megacarioblastos (burst-forming units-megakaryocytes, BFU-MK) y progenitores formadores de colonias (colony-forming units-megakaryocytes, CFU-MK) (Figura I-2). Los BFU-MK, considerados como progenitores más primitivos, proliferan más que los CFU-MK y forman múltiples focos con más de 50 células/colonia, mientras que los CFU-MK, considerados como progenitores más maduros, proliferan menos, producen un único foco de menos de 50 células/colonia y a diferencia de los BFU-MK, son sensibles a la exposición de 5-Fluorouracilo. En modelos murinos se han descrito los progenitores CFU-MK como células CD9⁺ CD41⁺ c-Mpl⁺, con escasa capacidad proliferativa y que se corresponderían con promegacarioblastos precoces (ver más adelante) (Debili *et al.*, 2004; Nakorn *et al.*, 2003).

2.3.- Cambios Morfológicos Celulares durante la Diferenciación Megacariocítica

Los MKs maduros son células que representan menos del 0.1% del total de células de la BM, donde residen primariamente, aunque también se encuentran en pulmón, bazo y sangre periférica (Patel *et al.*, 2005). Los MKs son células de gran tamaño (hasta 150 µm), multinucleadas y poliploides, que en su estadio final originan las PTs. En la generación de los MKs es fundamental el proceso de duplicación del ADN por endomitosis, en el que la célula duplica el ADN y entra en mitosis, pero no se produce una división del citoplasma ni del núcleo. El alto grado de ploidía alcanzado por las células permite un incremento de la síntesis proteica, que condiciona el tamaño celular, y éste a su vez el número de PTs que cada célula es capaz de producir. Una vez que el MK ha alcanzado su poliploidía definitiva, cesan las endomitosis y comienza el proceso de maduración

citoplásmica, en el que aparecen unas estructuras típicas, como el llamado **sistema de demarcación de membrana (DMS)**, que es una extensa red de membranas definiendo cisternas aplanadas, y túbulos. El DMS está en contacto con el medio externo, y se cree que se puede originar por invaginaciones de la membrana plasmática, de forma que podría suponer un reservorio de membranas en respuesta a la demanda de las mismas en el proceso de formación de PTs (Behnke, 1968; Shaklai y Tavassoli, 1978). También en el citoplasma se definen el **sistema tubular denso**, (lugar de síntesis de prostaglandinas) que no está en contacto con el exterior, y una amplia variedad de **gránulos**, que derivan del aparato de Golgi, entre los que destacan los gránulos alfa, los gránulos densos, gránulos de glucógeno y los lisosomas. Estos gránulos aumentan en número según madura el DMS del MK, y almacenan en su interior sustancias sintetizadas por el propio MK y sustancias endocitadas desde el medio exterior. Entre ellos destacan los gránulos alfa, que almacenan factores de crecimiento, proteínas de coagulación, moléculas de adhesión, citoquinas y factores angiogénicos, como son el factor plaquetario IV (PF4), la β -tromboglobulina, el VEGF- α , el factor de coagulación V, la trombospondina, la P-selectina, y el vWF (Italiano *et al.*, 2008). También almacenan fibrinógeno y albúmina (ALB), que adquieren mediante pinocitosis (Handagama *et al.*, 1990). Otros tipos de organelas son: los gránulos densos, que contienen altas concentraciones de ADP/ATP, calcio, magnesio, serotonina, y proteínas de membrana como CD63 (LAMP3) y LAMP-2, y lisosomas, que contienen LAMP-1, LAMP-2 y CD63, hidrolasas ácidas, catepsinas D y E y otras proteínas.

2.4.- Tipos Celulares Específicos en la Megacariocitopoyesis según su Morfología

Durante el desarrollo megacariocítico (Figura I-2), los **promegacarioblastos (pro-MG)** representan el 5-10% de los MKs. Su ploidía está entre 2N y 8N y, al microscopio óptico, son células pequeñas, que aparecen como células blásticas indiferenciadas, que en la BM del ratón pueden ser identificadas mediante tinción con acetilcolinesterasa (AChE) (Matsumura-Takeda *et al.*, 2007). Desde este estadio producen vWF (al igual que las células endoteliales), VEGF-A y el PF4, que es específico del linaje MK. Los proMGs pueden desarrollar mitosis completas o bien sufrir endomitosis y avanzar hacia los siguientes estadios de diferenciación. En función del grado de ploidía y del estado de maduración nuclear y citoplásmico, se definen otros estadios: 1) Los **megacarioblastos (MG)**, con un núcleo en forma de riñón, dos juegos de cromosomas (4N), y un diámetro que varía entre las 10-50 μm . Presentan una gran cantidad de ribosomas (citoplasma intensamente basófilo), carecen o tienen bajos números de gránulos, su membrana plasmática presenta un contorno irregular y tienen una tasa núcleo-citoplasma elevada. 2) Los **proMKs** son células sin divisiones nucleares, en proceso de maduración nuclear y citoplásmico, cuyo diámetro oscila entre las 20-80 μm . El citoplasma del proMK es menos basófilo que el del MG y contiene ya

algunos gránulos y DMS. 3) Finalmente, los **MK granulares** y **MK maduros**, en los que el DMS es muy evidente, ocupando casi todo el citoplasma a excepción de un anillo cortical.

2.5.- Patrón de Expresión de Glicoproteínas de Membrana, Integrinas y Receptores durante la Maduración Megacariocítica

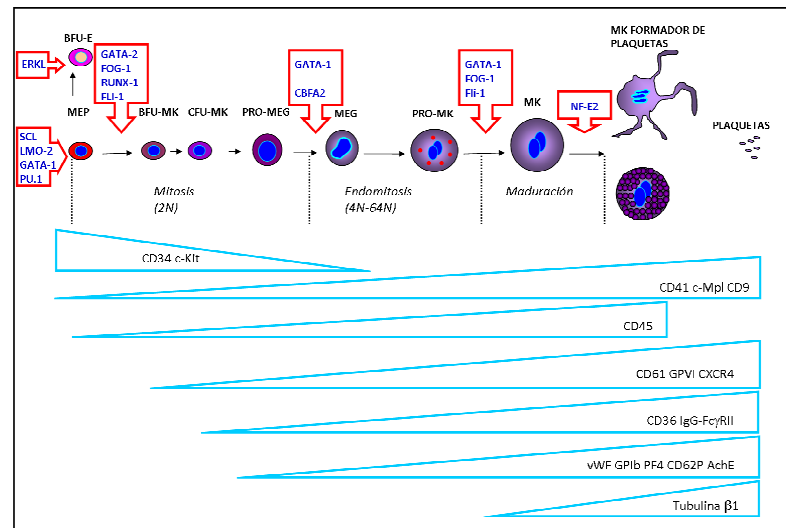
Las células del linaje MK expresan desde los estadios madurativos más tempranos diversas glicoproteínas (GP). Entre ellas, las integrinas GPIIb (cadena α IIb, CD41) y GPIIIa (cadena β 3, CD61), forman el receptor de fibronectina, fibrinógeno, ADP y vWF. Las moléculas CD41 y CD61 se localizan en la membrana celular y en la membrana de los gránulos alfa. CD41 es expresado a altos niveles por células del linaje MK y PTs, y a bajos niveles por HSC más inmaduras (Mikkola *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 1988). Sin embargo, CD61 es expresado también por monocitos y otros tipos celulares y, junto con la integrina α V (CD51), forma parte del receptor de vitronectina. Tanto ésta como la fibronectina, son proteínas de la matriz extracelular con distribución perivascular, por lo que la expresión de sus receptores permite situar a los MKs en este ambiente (Hynes, 1992).

Entre los receptores de colágeno expresados por MKs destacan las integrinas α 2 β 1 (CD49b/CD29) y la GPVI (CD36), que también forma parte del receptor de trombospondina. Estas GP son expresadas temprano y a bajos niveles durante la diferenciación megacariocítica, e incrementan su expresión en los MKs más maduros, permitiendo la adherencia funcional a colágeno sólo cuando su expresión aumenta (Laguer-Lak-Hal *et al.*, 2001). En MKs la GPVI está asociada con la expresión de la cadena gamma del receptor de la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR γ), siendo previa a la expresión de esta última en todos los estadios de maduración megacariocítica (Berlanga *et al.*, 2000) (Figura I-2).

Para la adhesión inicial de las PTs a la pared del vaso dañado es crucial el receptor CD42, formado por las moléculas GPIX (CD42a), GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c) y GPV (CD42d) (Gralnick *et al.*, 1994). Este complejo presenta un sitio de unión al vWF en GPIb α (CD42b), GPIX (CD42a) juega un papel esencial en la estabilización del multímero CD42, y GPIb β (CD42c) parece ser responsable de la expresión del receptor en superficie y participa en la señalización transmembrana por fosforilación de los dominios intracelulares (Tomer, 2004). La deficiencia del complejo CD42 se manifiesta en el síndrome de Bernard-Soulier, caracterizado por hemorragias y por presentar PTs ineficientes de gran tamaño, por lo que se sugiere que la expresión de este complejo es un paso importante durante la diferenciación megacariocítica final (Eisbacher *et al.*, 2001). Por otra parte, también se ha sugerido que el complejo CD42 puede jugar un papel en regular la megacariocitopoyesis, tanto por inducir la expresión del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina p21 (que está implicada en poliploidización), como por inducir la parada del ciclo celular en G1 (Kikuchi *et al.*, 1997). La expresión de CD42 es más tardía que CD41, aunque después del inicio de la síntesis de CD42 los niveles de expresión de ambos receptores están bien correlacionados, de tal forma que podríamos identificar la siguiente secuencia de diferenciación megacariocítica en

función de su expresión: $CD34^+CD41^-CD42^- \rightarrow CD34^+CD41^+CD42^- \rightarrow CD34^+CD41^+CD42^+ \rightarrow CD34^-CD41^{++}CD42^+ \rightarrow CD34^-CD41^{+++}CD42^{++}$ (Debili *et al.*, 2004). Es importante resaltar que la expresión del denominado antígeno (Ag) leucocitario común, CD45, que presenta actividad tirosina fosfatasa, aparece después de la de CD41 en todas las células hematopoyéticas (excepto en Ery y PTs), incluyendo en MKs, donde se expresa hasta estadios finales de diferenciación (Matsumura-Takeda *et al.*, 2007). Otros receptores expresados por MKs y compartidos también con otros tipos celulares son c-Kit, CXCR4 (receptor del factor derivado del estroma-1, quimioquina CXCL-12 o SDF-1), CD9 y c-Mpl, que son expresados desde estadios tempranos (BFU-MK) junto con CD41/CD61 (Tomer, 2004; Wang *et al.*, 1998).

Figura I-2.- Esquema de la diferenciación megacariocítica, en el que se muestran los principales factores de transcripción implicados y la expresión de diversos marcadores fenotípicos.



3.- REGULACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS

3.1.- Factores de Transcripción

La mayor parte de los complejos proteicos reguladores de la diferenciación de MKs son compartidos por el linaje Ery, lo que apoya su origen común en el MEP. En los progenitores más inmaduros, el balance entre los niveles de PU.1 y GATA-1 es crítico para promover la mielopoiesis o la eritropoiesis, respectivamente. Ambos factores se autorregulan positivamente y, además, inhiben mutuamente su expresión y su actividad (Burda *et al.*, 2009). Junto con éstos, un conjunto de factores de transcripción son fundamentales para el establecimiento de las HSC, y también, para el mantenimiento de células rojas y MKs en el adulto, como son SCL, Lmo2, GFI-1b y Fli-1 (Hart *et al.*, 2000; Mikkola *et al.*, 2003). Una vez superada la decisión del linaje mielóide, los factores GATA-2 (en los progenitores más inmaduros) y GATA-1 (que se intercambia por el anterior), en unión a FOG-1, son reguladores troncales de la diferenciación a MKs y Ery. GATA-1 y FOG-1 regulan la supervivencia y proliferación de precursores eritroides (pEry) al inducir la expresión de Bcl-x y el receptor de EPO (Epo-R) (Kapur y Zhang, 2001; Tsang *et al.*, 1997), la maduración megacariocítica al actuar sobre la expresión génica del PF4, del vWF, del c-Mpl, y del CD41 y CD42a, y finalmente están implicados en la regulación del tamaño y número de PTs (Wang *et al.*, 2002). El factor Eritroide-Krüppel-like (EKLF) que se expresa en estadios inmaduros eritroides y de MKs, promueve

la diferenciación eritroide final, pero también, por medio de la represión de la expresión de Fli-1, inhibe la diferenciación a MKs (Frontelo *et al.*, 2007). C-myc es esencial en la decisión de autorrenovación *versus* diferenciación de las HSC, promueve la diferenciación preferencial de progenitores Ery, y en su ausencia hay severa trombocitosis con anemia y leucopenia (Guo *et al.*, 2009). Por el contrario, Runx1, necesario para la emergencia de la hematopoyesis definitiva en el embrión (Okuda *et al.*, 1996), promueve selectivamente la diferenciación a MKs mientras “sustrae” las células del destino eritroide (Heller *et al.*, 2005; Ichikawa *et al.*, 2004; Song *et al.*, 1999; Sun y Downing, 2004). Finalmente y aunque expresado en estadios tempranos, el factor NF-E2 es crítico para la reorganización del citoesqueleto que lleva a la producción de PTs a partir de los MKs. Una de las posibles dianas de este factor es la tubulina $\beta 1$, isoforma específica de Ery, MKs y PTs (Hodivala-Dilke *et al.*, 1999; Schwer *et al.*, 2001; Shivdasani y Orkin, 1995; Wang *et al.*, 1986) (Figura I-2).

3.2.- Citoquinas y otros Factores de Regulación Molecular de la Megacariocitopoyesis

Tanto el desarrollo megacariocítico como la formación de PTs son reguladas, no sólo por la expresión de factores de transcripción como se ha visto anteriormente, sino también por el número de PTs en sangre periférica (Fielder *et al.*, 1996), por el establecimiento de interacciones celulares (p.ej., con células sinusoidales endoteliales de la BM, BMECs; Mohle *et al.*, 1997) y por la combinación de distintas citoquinas. Entre estas últimas, destacan la interleuquina-3 (IL-3) y la TPO.

La IL-3, producida en células NK y linfocitos T, así como en queratinocitos y otras células, es capaz de estimular de forma independiente los estadios tempranos del desarrollo megacariocítico hasta la fase de endomitosis y favorecer las fases finales de la diferenciación, al aumentar la ploidía y el tamaño de los MKs (Baatout, 1998). Pero, la IL-3 sola no es suficiente para que se produzca el desarrollo completo megacariocítico, requiriéndose al menos de una segunda citoquina, la TPO. La síntesis de TPO se produce principalmente en el hígado (hepatocitos), aunque también existe una producción menor en riñón, bazo y BM. La TPO actúa a través de su receptor c-Mpl, que es expresado no sólo por pMKs, MKs y PTs, sino también por otros tipos de progenitores hematopoyéticos, induciendo así su supervivencia y proliferación. En los pMKs, la TPO promueve las endomitosis, aumenta la ploidía y favorece la maduración citoplasmática. Además, induce la expresión de CD41, CD42b/c y CD61, y previene la apoptosis (de Sauvage *et al.*, 1994). Sin embargo, una vez han madurado los MKs, la liberación de PTs no precisa la acción directa de la TPO (Choi *et al.*, 1996).

Con el desarrollo de ratones deficientes para TPO o c-Mpl, se observó que aunque existía un descenso del 85% en las cifras de PTs, no se producía la supresión total de la megacariocitopoyesis, lo cual sugiere que aunque la TPO es necesaria para alcanzar una producción plaquetaria óptima, deben existir otros factores capaces de estimular el proceso (Gurney *et al.*,

1994; Gurney y de Sauvage, 1996). En este sentido, el factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF-4) y el SDF-1 actúan sinérgicamente llegando a normalizar el número de PTs en animales TPO^{-/-} y c-Mpl^{-/-} (Avecilla *et al.*, 2004).

Por otra parte, también es conocido el papel activador de la megacariocitopoyesis llevado a cabo por el GM-CSF, el SCF, la IL-6 y la IL-11. Los dos primeros actúan sobre todo a nivel de progenitores, mientras que la IL-6 y la IL-11, actúan en las fases finales de la maduración megacariocítica, aumentando la ploidía, el tamaño y la síntesis proteica de los MKs, y la formación de PTs (Hill *et al.*, 1991). Finalmente, otras sustancias presentes en la sangre, como la trombina y protrombina son capaces de inhibir la formación de PTs, bien directamente o liberando inhibidores de origen plaquetario (Hunt *et al.*, 1993).

3.3.- Generación de Plaquetas

Desde el descubrimiento de las PTs hace 120 años como elementos sanguíneos formes que provienen de los MKs, las teorías sobre su origen han variado. Durante años, se postuló que la generación de PTs se produciría por fragmentación del citoplasma, que estaría previamente dividido en unos territorios plaquetares (Yamada, 1957). Sin embargo, actualmente se postula que la liberación de PTs ocurre desde extensiones citoplasmáticas tipo pseudopodio, ya observadas por Wright en 1906 (Wright, 1906), que son emitidas hacia los sinusoides sanguíneos (Becker y De Bruyn, 1976; Radley y Haller, 1982). El ensamblaje de las PTs se produciría de “novo” en el extremo nodular final (“tip”) de estas extensiones citoplasmáticas (“shaft”), que se encuentran decoradas con abultamientos (“swelling”) y que son denominadas proplaquetas (proPTs). El DMS sería el reservorio de membranas para las futuras proPTs y no un sistema de partición citoplasmática (Schulze *et al.*, 2006). El hecho de que los MKs procedentes de ratones deficientes en el factor de transcripción NF-E2, que carecen de PTs, sean incapaces de formar proPTs *in vitro* (Levin *et al.*, 1999), o el no detectar anillos microtubulares en el citoplasma de los MKs antes de la fragmentación, soportan la teoría de liberación de PTs desde las proPTs (Radley *et al.*, 1987), y recientemente se ha podido observar *in vivo* la formación de PTs en la luz de los vasos de la BM a partir de proPTs (Junt *et al.*, 2007). Por otro lado, el descubrimiento y clonaje de la TPO y del c-Mpl, ha permitido grandes avances en el estudio de la trombopoyesis (Kaushansky, 2003), y ha hecho que la formación de proPTs sea un fenómeno bien caracterizado mediante cultivos *in vitro*. Hay que decir que las PTs liberadas *in vitro* por los MKs a partir de proPTs son funcional y estructuralmente similares a las PTs circulantes en la sangre (Choi *et al.*, 1995; Italiano *et al.*, 1999).

La formación de las proPTs es un proceso que se inicia una vez que el MK ha madurado y el citoplasma alcanza un diámetro de hasta 100 µm, aumenta el número de ribosomas, y se reorganizan tanto el DMS como el citoesqueleto (Patel *et al.*, 2005). La emisión de la proPTs comienza desde una única zona en el MK, donde se forman uno o más pseudopodios. En un

período de 4-10 horas, las protuberancias pseudopodiales se alargan a una velocidad media de 0,85 $\mu\text{m}/\text{minuto}$, presentando un diámetro medio de 2 a 4 μm y una longitud de 100 a 500 μm (Hartwig e Italiano, 2006). La generación de proPTs adicionales continúa cerca del punto de origen de la primera proPT en la membrana, y se extiende como una onda, por lo que el citoplasma megacariocítico queda transformado finalmente en una red compleja de proPTs interconectadas (Italiano *et al.*, 1999). Los núcleos quedan condensados en una masa central rodeados de poco citoplasma y son finalmente expulsados. Teniendo en cuenta que en un ratón hay $1,8 \times 10^5$ MKs en la BM (Kabaya *et al.*, 1996), y $2,2 \times 10^9$ PTs entre las circulantes y las presentes en el bazo, con una vida media de 5-6 días, esto supone que cada MK debe generar miles de PTs, lo que sería posible gracias a la amplificación del número de extremos finales mediante la ramificación de los filamentos proplaquetares (Harker y Finch, 1969; Hartwig e Italiano, 2006; Trowbridge *et al.*, 1984).

Los microtúbulos y los filamentos de actina tienen un papel esencial en la protusión de proPTs y en el transporte de partículas en su interior (Italiano *et al.*, 1999). Además la actina, que se detecta a lo largo de la proPT y se concentra en los abultamientos intermedios, también está implicada en el proceso de ramificación de las proPTs (Italiano *et al.*, 1999; Rojnuckarin y Kaushansky, 2001).

3.4.- Nicho Celular de la Megacariocitopoyesis

Se sabe que existen dos nichos de desarrollo celular en la BM: 1) **El nicho endosteal**, también denominado osteoblástico, en el que se encuentran las HSC y progenitores hematopoyéticos, y que es una localización que promueve la quiescencia de estas células. 2) **El nicho vascular**, que es la red sinusoidal vascular de la BM, que se define así como una entidad anatómica y funcional (Arai *et al.*, 2004; Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). La diferenciación y maduración celular están asociadas al movimiento centrípeto de las HSC y los progenitores desde el nicho endosteal al nicho vascular, desde el cual pasan a la circulación (Shackney *et al.*, 1975). Estudios ultraestructurales han demostrado que las células hematopoyéticas diferenciadas, más que las inmaduras, tienen una íntima asociación con la microvasculatura de la BM (Kiel *et al.*, 2005a; Shirota y Tavassoli, 1991; Tavassoli, 1992). De hecho, casi todos los MKs maduros se localizan adyacentes a la pared de los sinusoides y parecen ser capaces de transmigrar a través de las BMECs, a la par que emiten prolongaciones tipo proPT. Una baja expresión de vWF y del receptor de angiopoyetina-1 (Tie-2), y la expresión constitutiva de citoquinas y de moléculas de adhesión como VCAM-1 y Selectina-E caracterizan a las BMECs (Avecilla *et al.*, 2004; Kopp *et al.*, 2005). Se ha observado que estas células juegan un papel esencial en la hematopoyesis en animales mielosuprimidos, ya que los procesos de hematopoyesis y angiogénesis acontecidos durante el proceso de recuperación ocurren a la par y están interrelacionados. Las BMECs apoyan la proliferación y diferenciación de progenitores hematopoyéticos mediante la producción y

liberación de citoquinas y mediante el contacto celular. Co-cultivos de MKs y BMECs resultan en un aumento tanto de la supervivencia de las BMECs, posiblemente por la secreción de VEGF-A por parte de los MKs (Mohle *et al.*, 1997), como de la producción de PTs debido a la migración transendotelial de los MKs a través de las moléculas de adhesión VLA-4/VCAM-1 (Avecilla *et al.*, 2004). La inhibición de la cadherina vascular endotelial (VE-cadherin), implicada en la formación del endotelio y expresada transitoriamente durante la aparición y maduración de las HSC, resulta en una incapacidad del nicho vascular para apoyar la diferenciación megacariocítica y actuar como un conducto vascular (Avecilla *et al.*, 2004). Por otra parte, si durante la recuperación de la hematopoyesis tras mielosupresión se impide el incremento en los niveles de Tie-2 endoteliales, se inhibe la reconstrucción del nicho vascular y se retrasa la recuperación hematopoyética (Kopp *et al.*, 2005).

Diversos progenitores hematopoyéticos, y entre ellos los de los MKs, expresan el receptor del SDF-1, CXCR4. Se ha demostrado que esta quimioquina aumenta la afinidad y capacidad migratoria de los MKs a través de la BM, induciendo la localización de los MKs en el nicho vascular y su interacción con las BMECs (a través de moléculas de adhesión como VCAM-1; Avecilla *et al.*, 2004). Por otro lado el FGF-4 apoya la adhesión de los MKs a las BMECs. Como consecuencia, se potencia la supervivencia y maduración de los MKs y la formación de PTs en respuesta a FGF-4 y a SDF-1. El tratamiento con anticuerpos (Acs) anti-CXCR4, produce un bloqueo de la translocación de los MKs hacia el nicho vascular, y también impide el reclutamiento de las HSCs (Dar *et al.*, 2005). Por todo ello, se postula la existencia de un gradiente “haptotático” (Netelenbos *et al.*, 2003; Netelenbos *et al.*, 2002), en el que no sería tan importante la concentración absoluta de SDF-1 en solución sino la fracción de quimioquina inmovilizada y unida a componentes de la matriz extracelular, y de las células estromales de la BM. La secreción local en la BM de SCF induciría la activación de enzimas proteolíticas, como la metaloproteinasa 9 (MMP-9), que inactivan el SDF-1, permitiendo así que los progenitores CXCR4⁺ migren hacia el nicho vascular, que presenta mayores niveles de SDF-1 (Lane *et al.*, 2000). El hecho de que los MKs maduren en las inmediaciones del nicho vascular, en parte se debe a que allí se encuentran fuera del alcance de señales inhibitorias de su diferenciación, producidas por las células estromales y por la matriz extracelular (Avecilla *et al.*, 2004).

4.- HEMATOPOYESIS Y MEGACARIOCITOPOYESIS EMBRIO/FETAL

4.1.- Nichos primarios y generación de HSC en el embrión

En el embrión, existen varias localizaciones hematopoyéticas, que funcionan desde la aparición de los primeros progenitores hasta su llegada, al final de la gestación, a la BM. Esta existencia de múltiples sitios de producción de HSC en el periodo embrio/fetal, es un fenómeno observado desde anfibios hasta el ser humano (Jaffredo *et al.*, 2005). Se identifican dos nichos

primarios de producción de HSCs en el embrión, el YS y la P-Sp (de E8.5-9.5), que deriva del mesodermo de la placa lateral, y que más tarde dará lugar a la región aorta-gónadas-mesonefros (AGM, de E9.5-12.5) además de la placenta (Rhodes *et al.*, 2008), y varios nichos que son colonizados secuencialmente por HSC y diversos tipos de progenitores más o menos comprometidos a linaje (Cumano y Godin, 2007).

Las HSC se originan en el embrión a partir de un tipo celular del mesodermo primitivo posterior, el hemangioblasto, con el potencial de producir tanto células del linaje endotelial como del linaje hematopoyético (Choi *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 1997; Sabin, 2002). El hemangioblasto ha sido identificado por la expresión del factor de transcripción Brachyury, necesario para el desarrollo del mesodermo, y del receptor KDR, que es requerido para el desarrollo hematopoyético y endotelial *in vivo*. La especificación de células mesodérmicas hacia un destino hematopoyético depende también, entre otros, de la expresión de SCL/TAL-1 (Chung *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2005), y de señales procedentes del endodermo visceral como la proteína 4 de morfogénesis ósea (BMP-4), *Ihh* (Indian hedgehog) y el ácido retinoico (Baron, 2001; Dyer *et al.*, 2001; Ghatpande *et al.*, 2002; Sadlon *et al.*, 2004).

4.2.- Hematopoyesis primitiva y definitiva

Otro rasgo particular de la hematopoyesis fetal es la existencia de dos ondas de diferenciación, que difieren además de por su origen y localización, por el potencial hematopoyético de las células que originan, así como por la dependencia de factores de transcripción y programas génicos que son utilizados. Existe una onda de hematopoyesis primitiva, que comienza a día 7.5 en el YS, antes incluso de que se establezca la circulación (E9.5), que da lugar a pEry y células del linaje mieloide, y carece de potencial linfoide y de LT-HSC (Weissman *et al.*, 1978; Yoder *et al.*, 1997) (Figura I-3).

La onda de hematopoyesis definitiva se produce en la P-Sp/AGM del embrión, de forma independiente, a partir de E8.5. En ésta aparecen progenitores hematopoyéticos con actividad HSC y capacidad de dar lugar a células que se mantienen en el individuo adulto (Dzierzak *et al.*, 1998; Godin *et al.*, 1993). Estas HSC reconstituyen todas las células hematopoyéticas, al ser transplantadas en animales neonatos irradiados, pero no en adultos, indicando una mayor adecuación de los microambientes juveniles para sostener el desarrollo de HSC embrionarias (Kumano *et al.*, 2003).

Parece ser que estas HSC intraembrionarias, al igual que en el YS, se producen a partir de un progenitor también con potencial endotelial. Así, se ha descrito la aparición de progenitores hematopoyéticos desde la pared ventral de la aorta dorsal (sugiriendo la existencia de un endotelio hemogénico), en las arterias umbilicales y vitelinas (de Bruijn *et al.*, 2000) y en la placenta de ratón (Alvarez-Silva *et al.*, 2003; Gekas *et al.*, 2005). Las HSC embrionarias presentan, no sólo un origen

común con células endoteliales, sino que también comparten con ellas la expresión de gran cantidad de marcadores, por lo que ha sido difícil trazarlas desde su aparición (Matsumoto *et al.*, 2009). Así, expresan KDR, VE-cadherina, CD34, CD31 (Pecam-1) y c-Kit (Baumann *et al.*, 2004; Fraser *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Matsubara *et al.*, 2005). CD41 es el primer marcador de superficie que distingue las células comprometidas hacia el linaje hematopoyético de aquellas células endoteliales o mesodérmicas (Corbel *et al.*, 2005; Ferkowicz *et al.*, 2003). La expresión de CD41 en HSCs es transitoria, pues CD41 se pierde según van las HSC madurando, y sólo algunos progenitores comprometidos a linaje o los MKs mantienen su expresión (estos últimos a altos niveles) (Matsubara *et al.*, 2005). De forma inversa, las HSC embrionarias más inmaduras no expresan CD45 (marcador pan-hematopoyético), el cual aparecerá en ellas al madurar a partir de E11.5 (Matsubara *et al.*, 2005). En este estadio, también se produce un aumento en los niveles de expresión de Sca-1. Con la combinación de diferentes receptores pertenecientes a la familia de moléculas de señalización de activación linfocítica SLAM ($CD150^+CD244^-CD48^-$), se identifican HSCs desde el estadio de FL hasta el adulto (Kiel *et al.*, 2005b).

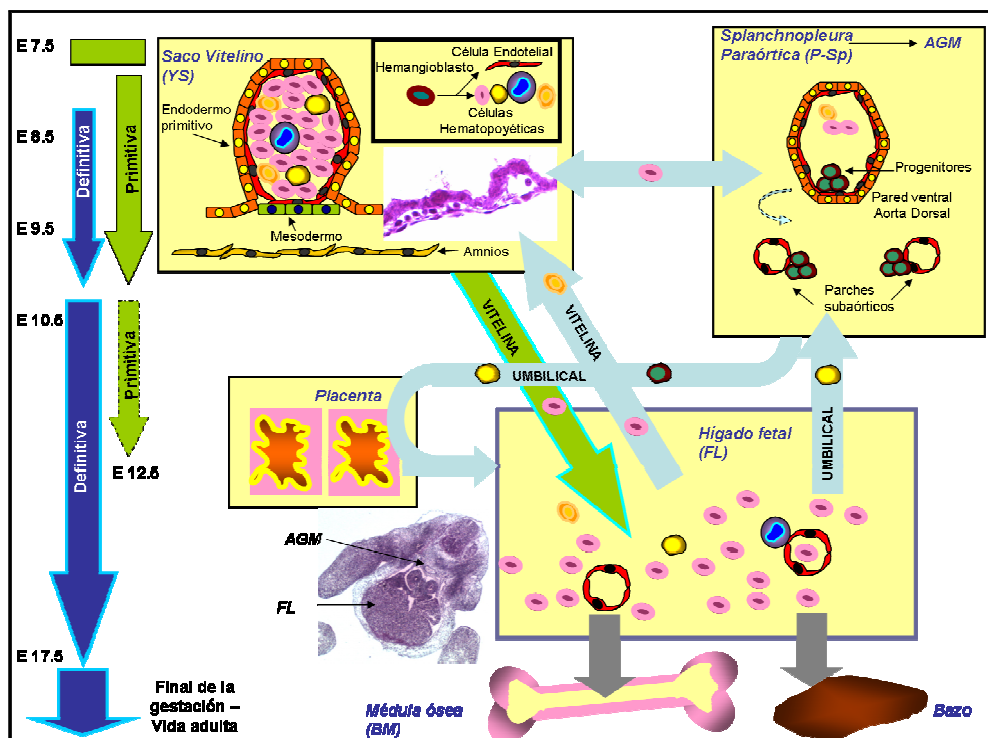


Figura I-3.- Nichos de hematopoyesis en el embrión de ratón. A la izquierda se esquematiza la duración de las dos ondas de hematopoyesis (primitiva y definitiva). A la derecha se indican los principales lugares donde tiene lugar la hematopoyesis embrionaria (YS y AGM). En el caso del YS aparece representado un islote sanguíneo, mientras que en el caso de la AGM se muestra la generación de HSC desde células de la pared ventral de la aorta dorsal o los parches subaórticos. A partir de E10.5, el FL pasa a ser el principal nicho hematopoyético, hasta el final de la gestación, cuando es sustituido por el bazo y la BM.

Existen diferencias respecto al requerimiento de distintos factores de transcripción en las dos ondas del desarrollo hematopoyético, por lo que pueden ser utilizados también como herramientas para trazar la aparición de HSCs definitivas. Así, la eliminación selectiva de genes como TAL/SCL y RBTN2 produce una anemia severa y un fenotipo letal por afectación de la hematopoyesis primitiva (Shivdasani *et al.*, 1995a; Warren *et al.*, 1994); la eliminación de GATA-2 afecta tanto a la hematopoyesis primitiva como a la definitiva, y la de otros como Runx-1, Cbf, c-myb, Ikaros, Jumonji, o Pbx-1, afecta negativamente a toda la hematopoyesis definitiva (North *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 1996). Notch1 participa en la hematopoyesis definitiva intraembrionaria (la hematopoyesis llevada a cabo en el YS es independiente de Notch1), y en concreto, influencia la autorrenovación de HSCs, la diferenciación linfoide y afecta a las decisiones del destino celular tomadas durante la hematopoyesis tanto fetal como adulta (Allman *et al.*, 2002; Robert-Moreno *et al.*, 2005).

4.3.- Eritropoyesis y Megacariocitopoyesis

Las primeras células hematopoyéticas diferenciadas en el embrión son células rojas primitivas que aparecen adyacentes a células endoteliales del endodermo visceral en los islotes sanguíneos del saco vitelino (YS) (Palis y Yoder, 2001). Los pEry primitivos (pEry-P) se producen para hacer frente a la demanda de oxígeno que presenta el embrión en crecimiento. Estos pEry-P se caracterizan por tener un gran núcleo, que será expulsado al terminar su maduración (aunque previamente se pensaba que no enucleaban) y por la expresión tanto de globinas embrionarias (hemoglobina β -H1 y las globinas ϵ y ζ) como adultas (globinas α y β) (Ferkowicz *et al.*, 2003; Isern *et al.*, 2008), mientras que los Ery formados durante la onda definitiva (pEry-D) sólo expresan las adultas. Un poco más tarde, el YS será capaz de albergar progenitores mieloeritroides definitivos (Palis *et al.*, 1999).

Existen evidencias que apuntan a la formación de MKs asociada a las dos ondas de hematopoyesis, y de que ésta es desde el principio bipotencial (Tober *et al.*, 2007), ya que se detectan colonias EMK derivadas de progenitores comunes para Ery y MKs (MEP). El grupo de Xu (Xu *et al.*, 2001) describió la presencia de progenitores megacariocíticos (pMKs) en el YS a E7.5, formando parte de la onda primitiva de hematopoyesis (pMKs-P). A diferencia de los Ery-P, en los que la expresión de hemoglobinas fetales permite separarlos de los Ery-D, en los pMKs-P no se han identificado patrones de expresión génica diferencial con los MK de la onda definitiva (pMKs-D). Aún así existen diferencias, los pMKs-P del YS a E8.5 son capaces de formar colonias *in vitro* en 2 días y de producir PTs 24 horas más tarde, en ausencia de citoquinas (TPO, IL3, EPO y SCF), y presentan un menor tamaño (8,8 μ m) que los pMKs-D fetales encontrados después de E10.5, cuya talla va aumentando con la edad gestacional, a la vez que su ploidía (4N de media).

Estudios de diferenciación *in vitro* con células embrionarias stem (ES) también muestran la existencia de dos tipos de pMKs, unos pequeños y que aparecen a día 8 de cultivo, y otros de mayor tamaño e hiperploides que se forman a día 12 de cultivo. Ambos producen PTs *in vitro*: las de la primera onda son redondas y con un número limitado de gránulos, mientras que las de la segunda onda, que se producen en mayor número, tienen forma discoidal, con gránulos bien desarrollados e indistinguibles de las PTs sanguíneas periféricas (Fujimoto *et al.*, 2003).

4.4.- El Hígado como Órgano Hematopoyético Fetal

A partir de E10.5, el FL se convierte en el órgano hematopoyético fetal por excelencia, ya que es el lugar donde las HSC se expanden y diferencian, hasta que la BM realiza esta función al final de la gestación (E17.5) (Houssaint, 1981). Las primeras células hematopoyéticas que colonizan el FL son progenitores mieloeritroides, procedentes del YS (E9.5-10.5). A E11.5 aparecen las HSCs, que lo colonizan desde la AGM y de la placenta. Un día después se inicia una gran expansión de las HSCs, alcanzando sus números máximos a E15.5 y decayendo posteriormente tras su traspaso a la BM y al bazo (Cumano y Godin, 2007). El primer linaje en desarrollarse *in situ* en el FL es el eritroide/megacariocítico, y después, a lo largo de la gestación, aparecen otras células del linaje mieloide y del linfoide (McGrath y Palis, 2005).

En cuanto a la megacariocitopoyesis, a partir de E11.5 el FL es el lugar predominante de la expansión de pMKs-D. El factor de transcripción c-myb es necesario para la generación de la megacariocitopoyesis definitiva, y de hecho, en los embriones c-myb-KO se detectan Ery-P y pMKs hasta E11.5 en YS, y un número de PTs normal a E12.5 (Guo *et al.*, 2009). Este dato indica que c-myb no es necesario para la maduración megacariocítica y demuestra que las PTs detectadas a días tempranos (antes de E10.5) proceden de la onda primitiva. A E11.5 las PTs son de gran tamaño (4-5µm) y en su mayoría altamente reticuladas, pues presentan altas cantidades de ARN. Entre E14.5 y E15.5 el 50% de las PTs siguen siendo reticuladas, aunque su diámetro celular disminuye (3-3.5µm) y es al final de la gestación, cuando el diámetro celular (2µm) y el número de PTs reticuladas se asemeja al del adulto. Las PTs embrionarias presentan gránulos alfa de menor tamaño y un sistema canalicular más desarrollado (Tober *et al.*, 2008).

En humanos, células CD34⁺ del FL contienen una mayor proporción de pMKs inmaduros (definidos por tener un DMS menos desarrollado y una expresión del vWF más tardía) que las células CD34⁺ derivadas de la BM adulta (Ma *et al.*, 2000). En el mismo sentido, injertos de células CD34⁺ de sangre de cordón umbilical tienen un retraso en la recuperación de PTs respecto a los trasplantes realizados con células de sangre periférica y BM adulta, lo que indica que los pMKs presentes en cordón son más inmaduros y tienen una menor capacidad de producir PTs (Bornstein *et al.*, 2001). Los MKs adultos son más grandes (20µm, que puede llegar a 100µm al inicio de la

formación de proPTs) y una ploidía de 16N, requiriendo 12 días para producir proPTs *in vitro*, y siempre con suero y citoquinas.

5.- DESARROLLO DEL HÍGADO

5.1.- Competencia, especificación y fases tempranas de su morfogénesis

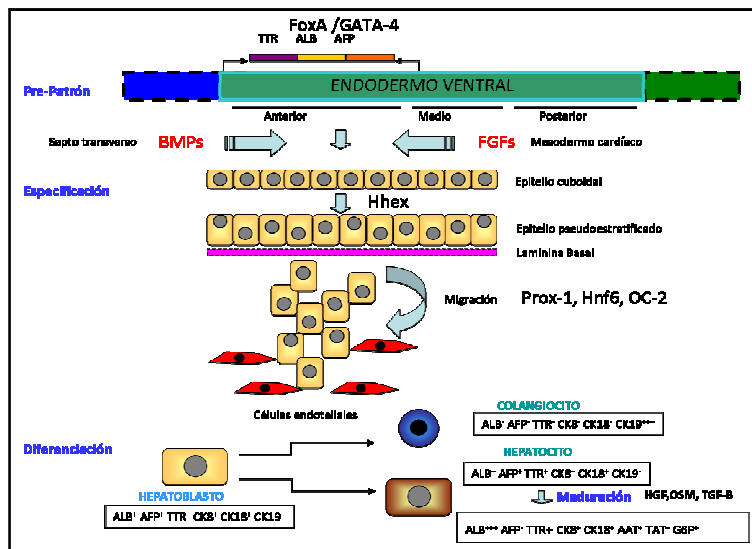
El papel predominante del hígado como órgano hematopoyético en la misma ventana temporal en la que se produce la neoformación hepática como órgano con funciones metabólicas, nos ha llevado a plantearnos de una forma más específica el estudio de la morfogénesis hepática. En el proceso de la hepatogénesis se distinguen diferentes etapas, a saber, (1) la definición de pre-patronos de expresión génica en las áreas celulares de “competencia”, (2) la especificación/restricción de precursores hepáticos (pHep) con programas genéticos establecidos en respuesta a señales intercelulares, (3) la migración, proliferación y expansión celular de los precursores emergentes, y (4) la diferenciación celular hasta alcanzar la funcionalidad completa (Duncan, 2000) (Figura 4).

(1) Competencia: A partir del endodermo embrionario (una de las tres capas germinales primarias que emergen en la gastrulación) se forman diversos órganos, como el tiroides, pulmón, páncreas, estómago, intestino e hígado. En particular, el hígado se origina a partir de células progenitoras situadas en la pared ventral del tracto digestivo anterior, en el estadio de 1 a 6 somitas (S) (Gualdi *et al.*, 1996; Tremblay y Zaret, 2005), mientras que del endodermo dorsal se deriva el intestino.

(2) Especificación: El endodermo intestinal adquiere diferentes identidades tisulares mediante interacciones locales con el mesodermo adyacente (Kumar *et al.*, 2003; Le Douarin, 1963; Serls *et al.*, 2005). El mesodermo cardíaco induce la formación del hígado en el intestino anterior ventral, cerca del estadio de 6S (Le Douarin, 1963). La secreción de los FGFs 1, 2 y 8 por el mesodermo cardíaco está implicada en la activación de genes hepáticos en el endodermo del intestino anterior, así como en la posterior expansión de las poblaciones de células pHep recién especificadas (Jung *et al.*, 1999). Las células mesenquimales del septo transversal que rodean a la región cardíaca en desarrollo, promueven el crecimiento y la diferenciación del recién especificado endodermo hepático (Le Douarin, 1975; Fukuda-Taira, 1981), por medio de la secreción de BMPs antes y durante la inducción hepática (Furuta *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1991). También se han implicado otras moléculas de señalización, como activina A, Sonic hedgehog (shh) y Wnt, en la formación del esbozo hepático (Deutsch *et al.*, 2001; Pilcher y Krieg, 2002).

(3) Migración/proliferación/expansión: En respuesta a los factores mesodérmicos antes citados, en el estadio 7-8S del desarrollo de ratón (E8.5), las células del endodermo hepático activan genes hepático-específicos tempranos (ALB, transtirretina –TTR-, y α -fetoproteína -AFP) y forman un epitelio columnar polarizado, con la superficie apical orientada hacia el lumen del

intestino y la superficie basal de cara al estroma. Este epitelio se engruesa y migra hacia el estroma del septo transversal, formando a E9.5 (22-27S) el esbozo hepático (Bort *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2003). En esta migración hay varios factores implicados, como Prox1 (Sosa-Pineda *et al.*, 2000), Hnf6 y OC-2, que regulan la expresión de E-cadherina y trombospondina-4, que son factores que median la adhesión y migración celular en varios contextos (Cirillo *et al.*, 2002). Entre las señales estimuladoras de la proliferación, y procedentes entre otros del mesénquima del septo transversal, se encuentra el factor de crecimiento hepático (HGF), cuyo receptor c-met es expresado por los pHeP embrionarios (hepatoblastos bipotenciales) (Bladt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1995). La señalización a través de c-met está mediada por la activación de c-jun (Auer *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1997), siendo la vía HGF/c-met/c-jun crítica para el crecimiento hepático temprano. Ratones deficientes para HGF, c-met o c-jun (Hilberg *et al.*, 1993) presentan una hipoproliferación y apoptosis del parénquima hepático y mueren entre E13.5-E16.5. Las células endoteliales que rodean e invaden al recién especificado endodermo hepático son también necesarias para la morfogénesis hepática, pues la ausencia de las mismas produce un defecto selectivo en el crecimiento hepático (Matsumoto *et al.*, 2001). En este sentido, las interacciones celulares encontradas entre células endoteliales y hepatoblastos durante la organogénesis son semejantes a los fenómenos descritos durante la regeneración hepática en el adulto, en el que las células



endoteliales promueven la misma a través de la señalización mediada por el HGF (LeCouter *et al.*, 2003).

Figura I-4.- Visión esquemática del proceso de morfogénesis hepática señalando los factores de transcripción implicados en cada etapa y la expresión de marcadores específicos de las células hepato-epiteliales.

(4) Diferenciación: Entre E12.5-E15.5 los hepatoblastos experimentan altas tasas de proliferación (Grisham, 1997), para posteriormente diferenciarse en hepatocitos y células biliares. Los hepatoblastos co-expresan programas genéticos característicos de ambos tipos celulares (p.ej., ALB, TTR, AFP, γ -glutamyl-transferasa -GGT-, citoqueratinas -CK- 8, 18 y 19) (Shiojiri *et al.*, 1991). En el último tercio de la gestación, los hepatocitos inmaduros activan la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo postnatal (glucosa-6-fosfatasa, tirosina-amino transferasa, α 1-antitripsina), incrementan la síntesis de ALB y “apagan” la expresión de AFP (Rothrock *et al.*, 1987).

Por el contrario, los colangiocitos dejan de expresar ALB y AFP, mientras mantienen la expresión de GGT y de la CK19 (Notenboom *et al.*, 2003).

5.2.- Estructura del hígado adulto

El hígado adulto presenta una estructura compleja, que viene determinada por sus múltiples funciones bioquímicas, de síntesis y transformación metabólica, y funciones excretoras, por las que los productos de desecho metabólico son secretados a un sistema ramificado de conductos conocido como árbol biliar, que a su vez drena en el intestino delgado. El hígado se divide en tres lóbulos, con una superficie externa recubierta por una cápsula fibrosa, compuesta por una monocapa de células mesoteliales, denominada Cápsula de Glisson. El hígado recibe la sangre de dos vías: de las arterias hepáticas (un 15% de sangre arterial oxigenada) y de la vena porta (el 85%, drena sangre del intestino, por lo que está repleta de nutrientes). La sangre sale del hígado a través de las venas hepáticas (Vollmar y Menger, 2009).

Desde el punto de vista celular, el parénquima hepático está formado por dos tipos celulares mayoritarios específicos, los hepatocitos que se disponen en láminas que separan espacios interconectados (sinusoides) y las células que conforman los conductos biliares (colangiocitos). Los sinusoides están delimitados por células endoteliales fenestradas, permitiendo así el acceso de los componentes de la sangre hacia la membrana sinusoidal de los hepatocitos. Entre las células endoteliales y los hepatocitos se encuentra el espacio de Disse y en el que encontramos otros tipos celulares minoritarios entre los que destacan las células de Ito (principal reservorio de vitamina A del organismo) y las células de Kupffer (macrófagos situados frente a la membrana sinusoidal de los hepatocitos) (Vollmar y Menger, 2009). La unidad estructural y funcional del hígado es el acino, formado por los llamados tractos portales (la vénula porta, la arteriola hepática y el ducto biliar) ubicándose alrededor de la vena central. La sangre fluye desde las vénulas portales y las arteriolas hepáticas, hasta la vena central. Es de destacar el hecho de que los hepatocitos tienen una alta capacidad proliferativa y sólo un daño extremo lleva a la activación de células progenitoras más indiferenciadas (células ovals) (Brill *et al.*, 1993).

6.- INFLUENCIAS HEPATO-EPITELIALES Y HEMATOPOYÉTICOS-MEGACARIOCÍTICOS EN LA MORFOGÉNESIS Y REPARACIÓN TISULAR

6.1.- Influencias durante las Etapas Iniciales del Desarrollo Hepático

El FL proporciona el ambiente ideal para la hematopoyesis durante la gestación a través de la producción de factores solubles, como el M-CSF (factor estimulante de colonias macrofágicas), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1 o CCL2), TPO, VEGF y EPO (Arcasoy, 2008; Fujio *et al.*, 1994; Schmelzer *et al.*, 2008; Shalaby *et al.*, 1997). En sentido inverso, las células hematopoyéticas están implicadas en el desarrollo hepático, ya que su ausencia, mediante

eliminación selectiva de c-myc únicamente en células hematopoyéticas, conduce a un fracaso en la expansión de los hepatoblastos que produce una hipoplasia hepática (He *et al.*, 2008). Las células hematopoyéticas producen factores como el HGF (Kamiya *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 1989), el TGF- β (Sanchez *et al.*, 1995; Wilcox y Derynck, 1988) y la oncostatina M (OSM) (Kamiya *et al.*, 1999; Kinoshita *et al.*, 1999), que promueven tanto el desarrollo como la maduración hepática. La concentración local de OSM aumenta a medida que avanza la gestación, y a partir de E14.5 se une a su receptor gp130/OSMR expresado en los hepatocitos inmaduros, promoviendo la diferenciación de los mismos, y disminuyendo la producción por éstos de moléculas que favorecen la hematopoyesis. De esta forma, a E18.5 los hepatocitos son incapaces de mantener *in vitro* el desarrollo hematopoyético, pues el ambiente proporcionado por el hígado deja de ser favorable para promover su desarrollo (Kinoshita *et al.*, 1999) y las células hematopoyéticas migran hacia la BM y al bazo.

6.2.- Papel de las Plaquetas en Hemostasis y en Reparación Tisular

Las PTs tienen un importante papel fisiológico en la hemostasis y trombosis. Después de un daño vascular, las PTs se adhieren al tejido subendotelial que queda expuesto, se activan y segregan proteínas liberadas desde los gránulos (como fibrinógeno, vWF, trombospondina y factor V). Estas proteínas interactúan con receptores de membrana específicos de PTs e inducen la agregación de más PTs, la conversión de protrombina en trombina y la formación de fibrina, para finalmente retraer el coágulo. Por otro lado, existen cada vez más evidencias de la participación de las PTs en otros procesos fisiológicos, como en inflamación (producción de ácido araquidónico, tromboxanos, VEGF, FGF básico, EGF, Ang-1, IGF-1 e IGF-2, PDGF, PF4, TGF- β 1, MMP-1, MMP-2, RANTES, MIP-1 α , etc) (Klinger, 1997), en angiogénesis (VEGF, PDGF, Ang-1, serotonina) (Weyrich *et al.*, 2003) y en mecanismos de defensa innata (posible fagocitosis, presencia de lisosomas) (Lewis *et al.*, 1976; Weyrich y Zimmerman, 2004). La liberación de factores de crecimiento derivados de las PTs promueve los procesos de reparación y remodelación tisular. En particular, son numerosos los trabajos que implican a las PTs en procesos tan importantes como la regeneración hepática tras hepatectomía (la inducción de trombocitopenia inhibe la regeneración tisular tras la misma) (Lesurtel *et al.*, 2006), la remodelación tisular asociada al asma (Morley *et al.*, 1984), la morfogénesis cardíaca, gastrointestinal y craneal (Cote *et al.*, 2007), en la megacariocitopoyesis (Liu y Yang, 2006) y en la proliferación de células mesenquimales (Gruber *et al.*, 2004). De forma similar, las PTs han sido implicadas recientemente en funciones de angiogénesis en tumores y en remodelación de los sistemas vascular y linfático en periodos embrio-fetales (Carramolino *et al.*, 2010; Clyman y Chemtob, 2010; Uhrin *et al.*, 2010) lo que extiende cada vez más sus funciones fisiológicas, y hace más relevante el estudio de sus mecanismos de generación en situaciones normales.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Como hemos mencionado brevemente en el apartado de *Introducción*, este trabajo se basa en la caracterización llevada a cabo por Minguet *et al.*, 2003 de una población de progenitores hepáticos bipotenciales (c-Kit^DCD45⁻Ter119⁻) a E11.5 en el FL de ratón. Esta población se puede subdividir en dos en función de los niveles de expresión de la integrina CD49f (población CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻). Este hecho nos llevó a postular la hipótesis de que ambas subpoblaciones podrían ser progenitoras de diferentes subtipos celulares relacionadas entre sí, por lo que nos planteamos los siguientes objetivos:

1.- Caracterización fenotípica, identificación, expresión génica y aparición ontogénica de las poblaciones celulares CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ presentes en el hígado embrionario del ratón a E11.5.

2.- Análisis del potencial de diferenciación *in vitro* y vías de generación de las poblaciones CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻, así como de su relación con otras poblaciones celulares presentes en el FL del ratón.

3.- Identificación del nicho celular ocupado *in vivo* por la población CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻KDR⁺ en la ventana temporal de E10.5 a E15.5. Relación con otros componentes del linaje hematopoyético (células mieloides, células eritroides y células progenitoras) y hepato-epitelial.

4.- Estudio de las posibles influencias mutuas entre las poblaciones CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻, presentes simultáneamente en el FL a E11.5

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1.-ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En este trabajo se utilizaron ratones (*Mus musculus*), pertenecientes a las cepas BALB/c, C57BL/6J y transgénicos C57BL/6J GFP⁺, que fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en el animalario del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO). Para la obtención de embriones, se realizaron cruces controlados durante la noche, determinándose el coito por la presencia de un tapón vaginal matinal, considerándose este momento como día 0.5 de gestación (E0.5).

2.-OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES A PARTIR DE DIFERENTES ÓRGANOS DEL EMBRIÓN DE RATÓN

Las hembras gestantes (E10.5-E15.5) fueron sacrificadas por dislocación cervical. El rosario uterino (que contiene los embriones), se extrajo y se colocó en una placa petri con PBS 1x + 2% FBS frío (solución de tinción; ST), para eliminar el exceso de sangre. A partir de este momento se trabajó sobre una capa de hielo, y después de cada manipulación se realizaron tres lavados en 50 ml de ST. Bajo una lupa binocular (microscopio estereoscópico Leica EZ4D) y con la ayuda de pinzas de microcirugía (Dumont número 5) estériles se aislaron los embriones y sus placentas (Figura MM-1). Posteriormente, se separaron las placentas de los embriones, se abrió el YS y se eliminó el amnios. Para separar el YS del embrión se cortó el cordón umbilical (arteria y vena vitelina). Los YS se recogieron en un tubo, y los embriones se desangraron en otro, en presencia de ST con 0,25 % de heparina sódica durante 15 minutos (Rovi, Madrid, España). Los embriones se recogieron de la solución y los linfocitos de sangre periférica (PBLs) se centrifugaron a 250G (1200 rpm) durante 5 minutos a 4°C (salvo que se indique lo contrario, las centrifugaciones se realizaron siempre de este modo). Los embriones se devolvieron a placas petri donde, mediante microdissección, se aislaron el FL y la P-Sp/AGM. Se obtuvieron suspensiones celulares de FL, AGM y YS mediante disgregación mecánica y paso por jeringuillas de 1 ml, equipadas con aguja de 25G. Tras una centrifugación, se realizó el recuento celular de las suspensiones obtenidas en cámaras de Neubauer, estimando la viabilidad por exclusión del colorante vital azul Tripán.

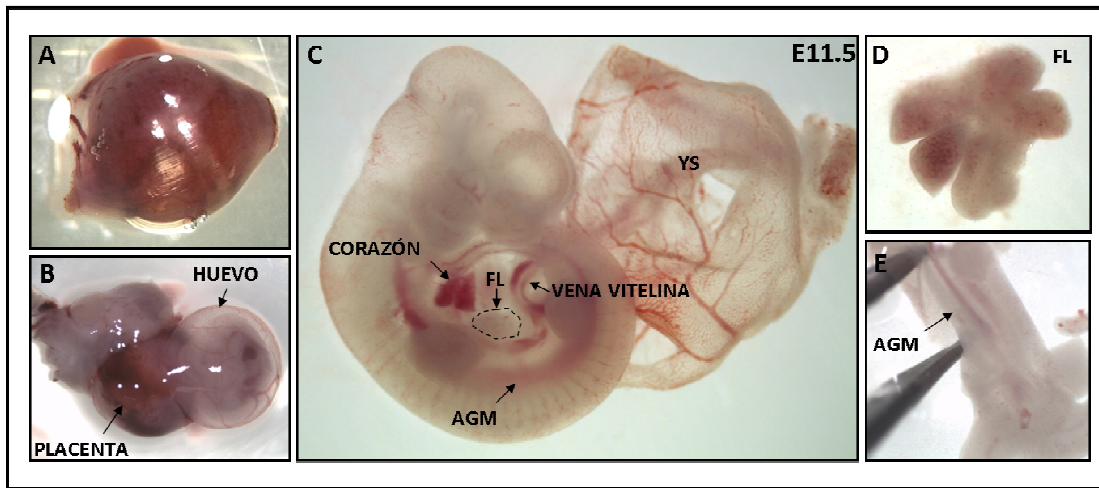


Figura MM-1.- Proceso de microdissección para la obtención de las muestras embrionarias a E11.5. En **A)** y **B)** se puede ver el huevo embrionario (YS+ embrión), en el interior del útero (**A)** o ya disecado (**B)**, con la placenta al lado. En **C)** se muestra el embrión fuera del YS (todavía unido mediante la vena vitelina), apreciándose el corazón, el FL y la AGM. Los dos últimos se muestran ampliados en **D)** y **E)** respectivamente.

3.-INMUNOFENOTIPADO POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CT)

a) Anticuerpos monoclonales, policlonales, reactivos secundarios y otros reactivos:

Los anticuerpos (Acs) monoclonales utilizados fueron previamente titulados con poblaciones celulares positivas para cada marcador. La relación de todos los Acs y reactivos, así como el formato, especificidad y compañía, se recoge en la Tabla MM-1.

b) Tinción de subpoblaciones celulares con Acs monoclonales.

Tras la obtención de las suspensiones celulares, las células se centrifugaron en ST antes de ser incubadas con ST suplementada con 10% de suero normal de ratón y un Ac frente a los FcγR (hibridoma 2.4G2; 3.5 µg/ml) durante 10 minutos, a 4°C. Una vez así bloqueadas, las células se incubaron 20 minutos a 4°C y en oscuridad, con los Acs monoclonales indicados. En el caso de los Acs purificados o biotinilados, se realizó una incubación adicional con un Ac secundario o con estreptavidina, acoplados a un fluoróforo (15 minutos a 4°C). Finalmente y tras un lavado con la ST, se resuspendieron las células en una ST suplementada con 50 ng/ml de yoduro de propidio (IP), para descartar, junto con los criterios de tamaño (FSC) y complejidad (SSC), las células muertas.

4.-PURIFICACIÓN DE POBLACIONES CELULARES

Para la purificación de las poblaciones celulares marcadas con Acs específicos, se utilizó CT preparativa (FACS) en un citómetro FACS Aria con el software FACSDiva 6.0 (Becton Dickinson). El diseño de las ventanas de separación se realizó de forma que existan varios canales de fluorescencia entre las poblaciones. La pureza de las poblaciones celulares utilizadas fue superior al 95%. En caso contrario las muestras fueron desechadas. Las muestras procedentes de embriones de ratón de más de 12 días de gestación se seleccionaron negativamente antes de la purificación,

para eliminar los eritrocitos Ter119⁺, que representan un alto porcentaje del total de células

ANTICUERPO / REACTIVO	AMPLIFICADOR (CLON)	MAFADOR	ESPECIFICIDAD	COMPAÑIA
ALBÚMINA		FITC	ALBÚMINA	CEBARIABE
CD18 (C7.116)		BIOTINA	CADENA β2 DE LAS INTEGRINAS.	BD PHARMINGEN
CD25 (Hs25)		BIOTINA	CADENA β1 DE LAS INTEGRINAS.	BD PHARMINGEN
CD31/PECAN1 (590)		BIOTINA	GLUCOPROTEÍNA CD31.	E B OSCENCE
CD31/PECAN1 (590)		FITC/PE	GLUCOPROTEÍNA CD31.	BD PHARMINGEN
CD34 (RAMB4)		PURIFICADO	GLUCOPROTEÍNA CD34.	BD PHARMINGEN
CD41 (MwReg33)		FITC/PE	CADENA α2β DE LAS INTEGRINAS.	BD PHARMINGEN
CD41 (MwReg33)		BIOTINA	CADENA α2β DE LAS INTEGRINAS.	ACRIS GENLIF ANTIBODY
CD42 (HsC3)		FITC	GNb α (PARTE DEL RECEPTOR DE LWF).	EMPRE ANALYTICS
CD45 (LCA-LY5/30F.11)		FITC/APC	ALELOS LY5.1 Y LY5.2 (CD45).	BD PHARMINGEN
CD45 (Hs4)		BIOTINA	ALELO LY5.2 DEL RECEPTOR CD45.	BD PHARMINGEN
CD48=BM1 (HM48-1)		APC	CD48 (MIEMBRO DE LA FAMILIA SLAM)	E B OSCENCE
CD49/CÉLULAS PAR-HK (H5)		BIOTINA	CADENA α2 DE LAS INTEGRINAS. SE ASOCIA CON CD29, RECEPTOR LAMININA, COLÁGENO Y FIBRONECTINA.	BD PHARMINGEN
CD49d		BIOTINA	CADENA α4 DE LAS INTEGRINAS. SE ASOCIA CON CD29 (RECEPTOR DE FIBRONECTINA).	BD PHARMINGEN
CD49 (Hs10-27/ VHS)		ALEXA 647	CADENA α5 DE LAS INTEGRINAS. SE ASOCIA CON CD29.	BIOLEGEND
CD49f (S0H3)		FITC/PE	CADENA α6 DE LAS INTEGRINAS. SE ASOCIA CON CD29 Y CD134 (RECEPTOR LAMININA).	BD PHARMINGEN
CD61 (CD62/ HMB3.1)		ALEXA 647	CADENA β3 DE LAS INTEGRINAS O GRN. SE ASOCIA CON CD41 (RECEPTOR DE WFF/ FIBRONECTINA) CON CD51 (RECEPTOR DE VITRONECTINA).	BIOLEGEND
CD71 (R17217)		PE	RECEPTOR DE TRANSFERINA.	E B OSCENCE
CD95=CD95 (AM.1)		APC	PROTEÍNA TRANSMEMBRANA TIPO 1 (CD95).	E B OSCENCE
CD105=ENDOG.11A (266)		PE	ENDOGUNA (RECEPTOR TGFβ1 Y 3).	MACS MILTENYI BIOTEC
CD117=CD117 (2B6)		ALEXA 488	RECEPTOR TIROSINQUINASA CD117, UGANDO DE 3CF.	BIOLEGEND
CD117=CD117 (23C)		FITC/APC	RECEPTOR TIROSINQUINASA CD117, UGANDO DE 3CF.	BIOLEGEND/BD PHARMINGEN
CD117=CD117 (2B6)		BIOTINA	RECEPTOR TIROSINQUINASA CD117, UGANDO DE 3CF.	BIOLEGEND
CD134 (S0H3)		BIOTINA	RECEPTOR DE FGF-1.	BD PHARMINGEN
FA/EC (HMB)		APC/BIOTINA	FA/EC	E B OSCENCE/BD PHARMINGEN
FALO D NA		TRITONIC	ACT NA-F	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
ICAM-1		PURIFICADO	MOLECULA DE ADHESIÓN INTERCELULAR. SE UNE A LFA-1.	PURIFICADO POR EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA (DR. IV. GASPAR)
Ig (H+L)		PE	Ig (H+L)	SOUTHERN BIOTECHNOLOGY
IgG		ALEXA 647	IgG TOTAL	MOLECULAR PROBES
IgG2a		BIOTINA	IgG2a	BD PHARMINGEN
IgM		FITC	IgM	CAKO
IgG TOTAL		ALEXA 488/568	IgG TOTAL	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
IgG1		ALEXA 488	IgG1	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
ISOTIPO		BIOTINA/FITC	CONTROL DE ISOTIPO.	BD PHARMINGEN
KDR/FLK1/VEGFR2 (Hs.78) (AVAS 12-01)		PE	VEGFR2.	BD PHARMINGEN
LFA-1		PURIFICADO	ANTÍGENO ASOCIADO A FUNCIÓN LINFOCITARIA 1 (CD11a/CD18)	PURIFICADO POR EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA (DR. IV. GASPAR)
NESTINA		PURIFICADO	FILAMENTO INTERMEDIO NESTINA.	BD PHARMINGEN
TEF1.9 (1176)		BIOTINA	MOLECULA ASOCIADA A GLUCOPROTEÍNA	BD PHARMINGEN
TIE-2/CD202 (TRK4)		BIOTINA	RECEPTOR TIROSINQUINASA CD202	E B OSCENCE
VCAM-1		PURIFICADO	MOLECULA DE ADHESIÓN VASCULAR (CD106).	PURIFICADO POR EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA (DR. IV. GASPAR)
wf		PURIFICADO	FACTO RYON WILLEBRAND.	CHEMICON
FITC		ALEXA 488	FITC	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
Edu		FITC	ANÁLOGO DE NUCLEÓSIDOS DE TIMIDINA	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
ESTREPTAMIDINA		ALEXA 555	BIOTINA	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
ESTREPTAMIDINA		FITC/PE/APC	BIOTINA	BIOLEGEND
DAPI			TINTE FLUORESCENTE ESPECÍFICO PARA DNA	CALBIOCHEM
TOPRO3			TINTE FLUORESCENTE ESPECÍFICO PARA DNA	INTROGEN (MOLECULAR PROBES)
ISA		CLAMINA 2	HSP	PERKIN ELMER

Tabla MM-1.- Anticuerpos monoclonales, policlonales, secundarios y otros reactivos utilizados en esta tesis.

hepáticas. Para ello se incubó la suspensión celular con el Ac Ter119 acoplado a biotina durante 20 minutos, a 4°C y en agitación, seguido de una incubación de 20 minutos con bolas inmunomagnéticas acopladas a estreptavidina (Dynabeads Streptavidin; Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Finalmente, los eritrocitos se eliminaron de la suspensión celular al ser retenidos por un imán, recogiendo la suspensión de células no adheridas al mismo.

5.- CULTIVOS CELULARES

a) Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue DMEM-10 (*Dulbeccos's Modified Eagle Medium*; DMEM, Lonza BioWhittaker, Verviers, Bélgica), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), 2 mM L-Glutamina, aminoácidos no esenciales, 100 U/ml Penicilina-Estreptomicina (todos estos reactivos de Lonza BioWhittaker, Verviers, Bélgica), 50 μ M 2- β -Mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 10^{-7} M dexametasona (Sigma), y 1 μ g/ml insulina humana biosintética (Novo Nordisk Pharma S.A, Bergsvaerd, Dinamarca). El medio así suplementado se denomina medio completo.

A este medio se añadieron los siguientes factores solubles hepato-específicos: 20 ng/ml HGF recombinante de ratón, 10 ng/ml de EGF y OSM recombinantes humana (Peprotech EC LTD, London, UK). En algunos casos, se utilizó una combinación de citoquinas que promueven la diferenciación a linajes linfohematopoyéticos: 10% IL-7 recombinante de ratón, 20 ng/ml SCF recombinante de ratón, 20 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml FLT3-L (Peprotech EC LTD, London, UK), 50 ng/ml TPO y 2 U/ml EPO.

b) Soportes de cultivo

Las células fueron sembradas en diferentes soportes, en función de su utilización final:

- Placas de 96 pocillos, tanto sin tapizar como cubiertas con colágeno tipo I (Discovery Labware, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA), en un volumen final por pocillo de 200 μ l. Para estudios generales de microscopía y recuperación celular para ARN.
- Portas de vidrio acoplados a cámaras de cultivo (Tissue Culture Chamber Slides, Discovery Labware, BD Biosciences, Bedford, Massachusetts, USA), sin tapizar y tapizadas con colágeno tipo I, fibronectina o laminina. El volumen final fue de 400 μ l/cámara. Estos soportes se usaron en el caso de llevar a cabo técnicas de inmunofluorescencia.
- Insertos transwell con una membrana microporosa de PTFE (espesor 30-50 μ m), cubierta con una mezcla equimolar de colágenos tipo I y III derivados de placetas bovinas, con un tamaño de poro de 0,4 μ m (especiales para llevar a cabo co-cultivos). Se pretrataron con medio completo a 37°C, añadiendo 100 μ l (inserto) y 600 μ l (pocillo inferior), 1 hora antes del cultivo. Tras retirar este medio se añadieron las células resuspendidas en medio completo fresco, manteniendo los volúmenes citados. Este tipo de cultivo permite estudiar

las influencias ejercidas por los factores solubles producidos por las diferentes poblaciones así como la importancia de los contactos célula-célula.

c) Condiciones de cultivo

Suspensiones celulares de FL y YS de E11.5 de gestación se distribuyeron en los distintos soportes de cultivo a una densidad de $1-2 \times 10^5$ células/cm². Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂, durante períodos variables de tiempo, refrescando el medio de cultivo cada 48 horas. Los cultivos se observaron diariamente desde día 0 a 10 de cultivo utilizando un microscopio Leica DMI3000B (Leica, Wetzlar, Alemania). En momentos seleccionados se capturaron imágenes con una cámara Leica DF420 (Leica, Wetzlar, Alemania). En algunos casos se realizaron cultivos en un microscopio invertido Leica DMI4000B (Leica, Wetzlar, Alemania), acoplado a una cámara de CO₂ (a 37°C y 95% humedad) y equipado con una cámara Leica DF360FX (Leica, Wetzlar, Alemania), realizando microfotografías secuenciales cada 2 minutos, durante períodos de entre 8-12 horas.

d) Ensayos de formación de colonias hematopoyéticas *in vitro* (CFU-C)

Se llevaron a cabo ensayos clonales para evaluar la capacidad de las diferentes poblaciones celulares purificadas para dividirse y formar colonias, así como su potencial de diferenciación. Para ello hemos empleado un medio comercial semisólido (*Methocult® GF M3434, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá*), que contiene una base de metilcelulosa, junto con una mezcla de citoquinas recombinantes que promueve la proliferación de células progenitoras hematopoyéticas de estirpe granulocito-monocito, megacariocítico y eritrocítica: 50 ng/ml SCF recombinante humano (rh), 20 ng/ml rh IL-3 (interleuquina-3), 20 ng/ml rh IL-6 (interleuquina-6) y 3 u/ml rh EPO, en IMDM, suplementado con 1% BSA (albúmina de suero bovino), 30% FBS (suero bovino fetal), 10^{-4} M 2-Mercaptoetanol, 2mM L-Glutamina, 10 µg/ml insulina rh, 200 µg/ml transferrina rh. En los casos indicados, se suplementó el medio de cultivo con TPO (50 ng/ml).

Las diferentes poblaciones celulares purificadas se resuspendieron en 50 µl de medio completo IMDM y 450 µl de Methocult® GF M3434. El ensayo se realizó por triplicado, sembrando entre 300 y 3000 células/pocillo en una placa multipocillo p48 (pocillos de 1 cm²; 11 mm de diámetro, placa multipocillo P48, NUNC™ Brand Products, Denmark). Las placas se incubaron a 37°C con una presión parcial de CO₂ del 5% y 95% de humedad. Después de 7-10 días de cultivo, se observaron las placas usando un microscopio invertido. Se contabilizó el número de colonias y el número de células/colonia. También se tipificó el tipo celular al que pertenecía cada colonia en función de criterios morfológicos establecidos y por CT, diferenciando CFU-GM (Unidades Formadoras de Colonias Granulocito-Monocito), CFU-E (Unidades Formadoras de Colonias Eritroides) y CFU-Mix (Unidades Formadoras de Colonias GM y E). En todos los casos, como control del ensayo, se utilizaron suspensiones celulares de FL y PBL sin purificar, y BM adulta, a la misma densidad celular.

6.- TINCIONES HISTOLÓGICAS, INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA

a) Preparación de las muestras

Las suspensiones celulares de FL procedentes de embriones a E11.5, así como de las diferentes poblaciones de células purificadas mediante FACS, fueron depositadas sobre portaobjetos de vidrio mediante centrifugación a 65G (300 rpm) durante 5 minutos en una citocentrífuga (Cytospin-4, Shandon, Reino Unido). Los cultivos celulares utilizados para el análisis mediante inmunofluorescencia se llevaron a cabo en cámaras de cultivo sobre portas como anteriormente se ha citado. Tras un período de incubación comprendido entre 2 y 7 días, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los portas con PBS 1x, antes de ser centrifugados a 166G (700 rpm) a 4°C durante 15 minutos. Ambos tipos de portas fueron sumergidos en una solución de fijación, que para las tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y la mayoría de inmunofluorescencias (a no ser que se diga lo contrario) e inmunohistoquímica fue paraformaldehído al 4% (PF4%), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para tinciones May-Gründwald Giemsa los portas fueron sumergidos durante 3 minutos a -20°C en metanol frío, tras lo cual se dejan secar por evaporación. Tras la fijación, los portas se lavaron con PBS 1x y se almacenaron a 4°C sumergidos en PBS 1x hasta su utilización.

Los embriones desangrados de ratón procedentes de períodos embrionarios E10.5- E15.5 y sus YS, fueron sumergidos en PF4%, durante 1 noche (E10.5- E12.5) o dos días (E13.5 y E15.5), en agitación continua y a 4°C. Tras ello se lavaron durante 6 horas con PBS 1x, realizando cambios (en agitación y a 4°C) y se introdujeron sucesivamente en una solución de sacarosa al 15% y al 30%. A continuación, los embriones fueron embebidos en el medio de congelación tisular OCT (*Jung Tissue Freezing Medium*, Leica Microsystems), orientándolos espacialmente en un molde de plástico rectangular, para obtener secciones transversales, sagitales o longitudinales. Finalmente, fueron congelados progresivamente colocando el molde de plástico, con el embrión embebido en OCT, sobre un lecho de nieve carbónica. Los moldes fueron conservados a -80°C hasta su utilización. Mediante un criostato (Leica CM 1850), se obtuvieron cortes de 5-8 µm, que fueron recogidos sobre portaobjetos (*Star Frost microscope slides, adhesive weiss/white*) y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las muestras de tejido procedentes de ratones adultos, se procesaron de la misma manera, a excepción del tratamiento con sacarosa.

b) Tinción HE

Los portaobjetos se lavaron con PBS 1x (en el caso de muestras *ex vivo* o cultivos) o en agua (secciones histológicas) durante 5 minutos y en agitación continua. A continuación, se sumergieron en hematoxilina de Carazzi (Panreac Química S.A, Barcelona, España) durante 10 minutos y se lavaron con agua del grifo durante 5 minutos. Se tiñeron con eosina amarillenta hidroalcohólica al 1% durante 1 minuto (Panreac Química S.A, Barcelona, España) y se lavaron con etanol puro (Merk) durante 5 minutos. Finalmente los portaobjetos fueron introducidos en

xilol/xileno y montados con Depex (ambos de BDH, WWR Internacional Ltd. Poole, England). La hematoxilina es un colorante básico que tiñe de morado las estructuras ácidas (núcleos celulares), por el contrario, la eosina es un colorante acidófilo, que tiñe de rojo o rosa los componentes básicos. Como resultado de esta tinción, los núcleos aparecen azules/morados, los citoplasmas rosas, los eritrocitos rojos/anaranjados y la fibrina rosa.

c) Tinción May-Gründwald Giemsa

Después de la fijación, los portas se sumergieron 3 minutos en el colorante May-Gründwald (Materlab) preparado al 50% en agua destilada y se lavaron con agua corriente. Luego fueron teñidos con solución de Giemsa (Materlab) (1,5 gotas de giemsa por cada mililitro de agua destilada) durante 15-30 minutos (en función del tipo celular y de la muestra). Finalmente se lavaron con agua del grifo, se secaron al aire y se montaron con Depex. La solución May-Gründwald contiene eosina y azul de metileno diluidos en metanol. El azul de metileno tiene apetencia por las estructuras basófilas, tiñéndolas de azul.

d) Inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Las preparaciones de muestras *ex vivo*, cultivos y secciones tisulares de embriones de ratón (tanto de la cepa BALB/c como C57BL/6J) de diferente edad gestacional, fueron utilizados para detectar diferentes Acs mediante inmunofluorescencia (ver tabla MM-1). Para ello se llevó a cabo un lavado de los portas previo de 10 minutos con PBS 1x + 0,1 % Tween-20 (PBT), a temperatura ambiente y en agitación continua. A partir de este momento todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda (a excepción de los lavados intermedios en PBT) a temperatura ambiente y en oscuridad, a no ser que se especifique lo contrario. Tras la rehidratación se realizó un tratamiento con NH_4Cl 50 mM durante 15 minutos, para disminuir la autofluorescencia de la muestra e impedir la unión de los Acs a los grupos amino libres que queden tras la fijación con PF4%. A continuación, se incubaron los portaobjetos durante 30 minutos en una solución de bloqueo (SB) que evite la unión inespecífica (2% BSA 0,1% Tritón X-100 en PBS 1x). Finalmente se llevó a cabo la incubación toda una noche a 4°C con el Ac deseado (previamente centrifugado a 12000 rpm, 5 minutos) diluido en la SB. En el caso de utilizar dos Acs marcados directamente, ambos Acs se incubaron a la vez. En aquellos casos en los que se utilizó algún anticuerpo purificado, las incubaciones se hicieron secuenciales, revelando el Ac primario con uno secundario (90 minutos a temperatura ambiente).

El protocolo seguido con los Acs biotinilados incluyó una inhibición de la biotina endógena, antes del tratamiento de autofluorescencia con NH_4Cl , con un kit de Dako Cytomation (*Biotin Blocking System*) siguiendo las especificaciones del fabricante. El revelado de los Acs biotinilados se llevó a cabo por dos métodos alternativos: a) Incubación con estreptavidina unida a un fluoróforo (1 hora de incubación, a temperatura ambiente y en oscuridad); b) Uso de un kit de amplificación de la señal mediante tiramida (Tyramide Signal Amplification – TSA Cyanine 3 System;

PerkinElmer LAS, Inc, Boston). En este caso y tras inhibir la biotina y tratar con NH_4Cl 50 mM, se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena con 0,3% H_2O_2 en metanol (10 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad). A continuación se realizó el bloqueo mediante una solución suministrada por el kit de TSA y que también se usó para diluir los Acs biotinilados y la estreptavidina-HRP. Después de incubar con los Acs biotinilados correspondientes, éstos se revelaron con la estreptavidina-HRP. Finalmente se añadió durante 10 minutos una solución de cianina 3 acoplada a tiramida (diluida 1:50 en un buffer de amplificación suministrado por el kit).

En algunos casos fue necesario amplificar la señal de determinados Acs que estaban acoplados a fluoresceína (FITC), p. ej., el Ac anti-albúmina o si se realiza un doble marcaje con un Ac acoplado a fluoresceína y con un Ac biotinilado y amplificado con el kit TSA, ya que el tratamiento con H_2O_2 afecta a la fluoresceína. Para ello se recurrió, al finalizar la tinción previa, al uso de un Ac anti-FITC acoplado a alexa fluor 488 (90 minutos, temperatura ambiente, en oscuridad).

Tras el revelado de los Acs, se contrastaron los núcleos durante 30 minutos con 4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-1-propenyl]-1-[3-(trimethylammonio)propyl]-diiodide (TOPRO-3; Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA), o con 4',6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro 10mM (DAPI; Molecular Probes) durante 10 minutos.

Para la tinción inmunohistoquímica con el Ac Ter119 biotinilado, se inhibió la biotina endógena y se bloqueó la peroxidasa con H_2O_2 como previamente se ha citado. El revelado se realizó con una estreptavidina-HRP, tras lo cual se utilizó como cromógeno diaminobencidina (DAB, Dako Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System) y los núcleos fueron contrastados con hematoxilina de Carazzi (10 minutos).

En todos los casos, se realizaron controles de isotipo con los Acs pertinentes. Las preparaciones se sellaron para su análisis con un medio de montaje que ayuda a prolongar/preservar la fluorescencia, como es el Prolong Gold (Invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA) o en el caso de tinciones inmunohistoquímicas, con Depex. Finalmente las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal LSM 510 Vertical (Carl Zeiss Microscopy, Deutschland) o en un microscopio confocal multiespectral Leica SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania).

e) Ensayos de proliferación celulares

Las hembras gestantes a E11.5 fueron inyectadas con 150 μg de EdU (5-ethynyl-2'deoxyuridine, Click-iT® Edu Imagin Assay, Invitrogen, Molecular Probes®) en PBS 1x. Tras 4 horas se procedió al sacrificio de las hembras. Los embriones se procesaron para obtener secciones tisulares, como se describe anteriormente. EdU es un novedoso análogo de nucleósidos de timidina, de pequeño tamaño con lo que, a diferencia del BrdU, no es necesario permeabilizar ni tratar las muestras para revelar su incorporación. Su detección *in vivo* se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante, y se combinó con técnicas de inmunofluorescencia para trazar diferentes marcadores hematopoyéticos.

7.- DETECCIÓN DE TRÁNSCRITOS ESPECÍFICOS POR PCR Y PCR A TIEMPO REAL

La extracción de ARN total así como la preparación de ADNc de muestras *ex vivo* (suspensiones celulares de órganos completos y poblaciones purificadas mediante FACS) y cultivos celulares, se realizó siguiendo métodos anteriormente descritos (Gaspar *et al.*, 1990). La síntesis de ADNc se realizó sobre muestras de ARN (10 µl) desnaturalizadas por calor (65°C 10 minutos), utilizando 1µg de oligo-(dT) como cebador y 1 U de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis avícola (AMV-RT; Promega, Madison, EE.UU). Las reacciones de amplificación de transcritos específicos mediante PCR, se llevaron a cabo sobre alícuotas (1/25 del volumen total) de ADNc utilizando 1 U de Taq polimerasa (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania). Los ciclos de PCR consistieron en: a) Una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, b) sucesivos ciclos de PCR (40), que constan de un primer paso de 95°C durante 1 minuto, seguido de un 1 minuto a la temperatura de anillamiento/hibridación (específica del par de oligonucleótidos usados como cebadores para amplificar), y un paso de polimerización a 72°C durante 1 minuto y c) Un paso de polimerización final de 10 minutos a 72°C. Para estimar la cantidad de ARNm inicial de cada muestra, se utilizó el nivel de transcritos del gen *GαS* (gen “housekeeping” que es expresado constitutivamente). Los cebadores se eligieron en diferentes exones de los genes a cuantificar, de forma que el tamaño del fragmento amplificado en el caso del ADN genómico y del ARNm fuera muy diferente. Los productos de la reacción de PCR (1/5 del volumen) se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un aparato Gel DocTM XR (BioRad Laboratories), adquiriéndose las fotos con la ayuda del software Quantity One[®] 4.6.7. En la Tabla MM-2 aparecen resumidas las secuencias de los oligonucleótidos usados, las temperaturas de anillamiento y el tamaño de los fragmentos amplificados.

La PCR a tiempo real (PCR-TR) permite realizar una cuantificación precisa del nivel de transcritos siendo los valores obtenidos directamente proporcionales a la cantidad de molde inicialmente presente en la reacción. Para llevar a cabo la PCR-TR se utilizó el kit LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania) según el método basado en el uso del colorante fluorescente SYBR Green I, que emite fluorescencia sólo cuando se une a ADN de doble hebra. La detección de fluorescencia se realiza en cada ciclo y la cantidad de material amplificado se define por aquel ciclo en el que la fluorescencia comienza a detectarse (expresado por el Crossing Point, Cp). De este modo, las muestras con un menor Cp serán las que posean mayor expresión de un determinado transcrito. Al igual que en el caso de la PCR convencional, para normalizar la cantidad de ARN total de cada muestra, se utilizó la expresión del gen *GαS*. La cuantificación relativa se llevó a cabo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen, 2001), cuya fórmula es la siguiente:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Cp \text{ target}_{\text{muestra}} - Cp \text{ G}\alpha S_{\text{muestra}}) - (Cp \text{ target}_{\text{calibrador}} - Cp \text{ G}\alpha S_{\text{calibrador}})]}$$

El gen diana o target es el gen de ALB y el calibrador una suspensión de FL11.5 sin purificar. En ensayos preliminares se determinaron las condiciones de amplificación sobre diluciones seriadas de ADNc de hígado total para calcular la eficiencia de la reacción, que fue de 2.01.

La PCR-TR se realizó en capilares (volumen final 20 μ l), con la mezcla de reacción que especifica el fabricante: $MgCl_2$ 2mM; cebadores (4 μ g/ml de concentración final de cada uno de ellos) y 2 μ l de LC-FastStart DNA Master SYBR-Green I 1x, junto con 1/25 del ADNc. Los capilares se alojaron en el carrusel del LightCycler 4.0 (Roche Molecular Biochemicals, Manneheim, Alemania) tras una breve centrifugación a 635G (3000 rpm). La reacción se llevó a cabo con el siguiente programa: 10 minutos de preincubación a 95°C, seguidos de 55 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 10 segundos de hibridación a 60°C y 20 segundos de elongación a 72°C. La medida de la señal de fluorescencia se efectuó a 530 nm durante la fase de extensión de cada ciclo. Al finalizar la amplificación se efectuó un análisis de las curvas de disociación del producto de amplificación aumentando la temperatura a razón de 0,1°C/s desde 65°C hasta 95°C, registrando continuamente la señal de fluorescencia a 530 nm, y el tamaño de los fragmentos se verificó también mediante separación electroforética en geles de agarosa, según se indica más arriba.

Gen	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño (pb)	Tª H	Referencia
ALB	5' AGA AGA CAC CCT GAT TAC TCT 3' 5' TCG AGA AGC AGG TGT CCT TGT 3'	702	60 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
Gα	5' ATT GAA ACC ATT GTG GCC GCC ATG AGC 3' 5' GAA GAC ACG GCG GAT GTT CTC AGT GTC 3'	821	60 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
HGF	5' ACA AAC AAC AGT AGG GTG GA 3' 5' AGC AGG AAC AAT GAC ACC AA 3'	585	52 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
AFP	5' TCA CAC CCG CTT CCC TCA TCC T 3' 5' CAT CCT GCA GAC ACT CCA G 3'	820	55 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
AAT	5' TCA ACA GAC CAG ACA GTG AGC T 3' 5' AAA GGG TGG TCG AAG GCG A3'	805	55 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
TTR	5' ATC CAC AAG CTC CTG ACA G 3' 5' ACT GCT TTG GCA AGA TCC TGG 3'	504	60 °C	Minguet <i>et al.</i> , 2003
Nestina	5' CGC TGG AAC AGA GAT TGG AAG 3' 5' GTC TCA AGG GTA TTA GGC AAG 3'	375	62 °C	Este trabajo
Vimentina	5' ACA GGA TGT TGA CAA TGC TTC TC 3' 5' AGA CCA GAG ATG GAC AGG TGA T 3'	743	55 °C	Este trabajo
GPIbα (CD42b)	5' TGT GAC ACC ACA TAG TGT GGA 3' 5' TGA AGT CGT AGG ATC TCC ACT 3'	314	60 °C	Li <i>et al.</i> , 2003
vWF	5' CCA CTT GCC ACA ACA ACA TC 3' 5' TTC ATC CAG GAT TCT CCC TG 3'	425	60 °C	Este trabajo
KDR/FLK-1	5' GGT TCT CTG TCA AGT GGC GGT 3' 5' TCT TTC GGT GTC TTG CTC TG 3'	237	60 °C	Cedidos por el Dr. José Luis de la Pompa (CNIC)
VEGF-A	5' GAT CAT GCG GAT CAA ACC TCA CC 3' 5' CCT CCG GAC CCA AAG TGC TC 3'	V120 (308pb) V164 (440pb) V188 (512pb)	59 °C	Greenberg <i>et al.</i> , 2002

Tabla MM-2.- Se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las PCRs, tamaños (pares de bases; pb), temperaturas de hibridación (TªH) y referencias bibliográficas de cada gen amplificado (Greenberg *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003; Minguet *et al.*, 2003).

8.- PROGRAMAS DE ANÁLISIS UTILIZADOS

a) El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EEUU). Los números mostrados representan la media \pm error estándar de la media (SEM) y en los casos indicados se muestra el rango de las distribuciones. Las comparaciones entre valores de diferentes muestras o condiciones se calcularon mediante el test de la *t de Student* y la realización de tablas de contingencia (*Chi cuadrado*).

b) El procesamiento de las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia confocal se llevó a cabo con diversos programas:

- Confocal Zeiss Image Browser 4.2: Para visualizar las imágenes capturadas con el microscopio confocal LSM510 vertical (Carl Zeiss, AG, Deutschland), medición de diámetros celulares, así como la transformación del formato con el que se toman las imágenes (.lsm) al formato .tif (*Tagged Image File Format*).

- ImageJ: Para la corrección de brillo/contraste de las imágenes, los contajes celulares, así como la realización de las reconstrucciones 3D (imágenes de microscopía confocal tomadas en los ejes x,y,z).
- Adobe Photoshop 7.0: Para la visualización de los distintos canales por separado.

c) Para el montaje de los vídeos procedentes de cultivos llevados a cabo en el microscopio invertido Leica, acoplado a una cámara de CO₂, se utilizó el programa LAS_AF lite 2.0 (Leica). Los fotogramas se tomaron cada 2 minutos, con una duración media de 8-12 horas/vídeo.

d) El software LightCycler 4.0 (Roche Diagnostics GMBH, Germany) fue utilizado para calcular el “threshold cycle” o “crossing point” de cada reacción, así como la especificidad de la misma, a través del análisis de las curvas de disociación (Melting).

e) El análisis de los datos de CT, se llevó a cabo con los programas FlowJo 6.3.4 (Tree Star, Inc., Stanford University, CA) y CellQuest Pro 5.2 (BD Biosciences, Bedford, Massachusett, USA). Para la purificación celular (FACS) se utilizó el programa FACSDiva 6.0 (Becton Dickinson).

RESULTADOS

RESULTADOS

1.- LA POBLACIÓN PROGENITORA DE CÉLULAS HEPÁTICAS Y COLANGIOCITOS $c\text{-Kit}^D\text{CD45}^-\text{TER119}^-$, PRESENTE EN EL FL A E11.5 DE GESTACIÓN, ES HETEROGÉNEA Y CONTIENE PROGENITORES DE LINAJE MEGACARIOCÍTICO (pMKs).

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Minguet *et al.*, 2003) describieron una población de células progenitoras bipotenciales presente en el FL del ratón a E11.5, que genera hepatocitos y colangiocitos. Esta población, que fue definida por una baja expresión del receptor c-Kit (marcador de células indiferenciadas de diversos linajes) y por la ausencia de los marcadores hematopoyéticos CD45 y Ter119 ($c\text{-Kit}^D\text{CD45}^-\text{Ter119}^-$) (Figura R-1A), era positiva para la expresión de genes hepáticos tempranos (ALB, TTR y αFP) y de maduración hepática (AAT, GGT y TAT). El análisis de la expresión de la integrina $\alpha 6$ (CD49f) en las células $c\text{-Kit}^D\text{CD45}^-\text{Ter119}^-$ mostró un patrón bimodal, definiendo una subpoblación con niveles de expresión elevados (*high*; CD49f^H) y otra débil o prácticamente negativos (*dull*; CD49f^D) (Figura R-1B). La cadena $\alpha 6$ forma, junto con la cadena $\beta 1$ (CD29), el receptor de laminina (VLA-6). Esta matriz es expresada en el primordio hepático y según avanza la gestación su presencia disminuye hasta quedar reducida a áreas periportales en el hígado adulto (Couvelard *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2000). La expresión bimodal de CD49f indicaba que la población de progenitores hepato-epiteliales identificados por nosotros era heterogénea, por lo que nos planteamos estudiar ambas subpoblaciones en profundidad. Para analizar de forma más detallada los linajes celulares presentes en E11.5, utilizamos diferentes combinaciones de Acs y CT. En primer lugar realizamos tinciones triples con los Acs anti-CD49f, anti-c-Kit y anti-CD45 (Figura R-1C,D), observando que entre las células que expresan CD49f^H , aquellas que presentan altos niveles de c-Kit co-expresan también CD45 y por lo tanto pueden ser identificadas como progenitores de células hematopoyéticas ($\text{CD49f}^H\text{c-Kit}^H\text{CD45}^+$). Casi la mitad de las células CD49f^H que expresan bajos niveles de c-Kit ($c\text{-Kit}^D$), son negativas para CD45, al igual que lo es la población $\text{CD49f}^D\text{c-Kit}^D$. La población $\text{CD49f}^H\text{c-Kit}^D\text{CD45}^-$ representa un $8,0 \pm 3,4\%$ (media \pm SEM, $n=10$) de todas las células del FL a E11.5 (Figura R-2A), mientras que la población $\text{CD49f}^D\text{c-Kit}^D\text{CD45}^-$ supone un $4,7 \pm 2,6\%$ ($n=10$). Sin embargo, a E13.5, esta última población aumenta no sólo su porcentaje sino también extraordinariamente sus números absolutos (de $3,6 \times 10^3$ a $6,3 \times 10^5$ células/hígado, aumento de 175 veces), mientras que la población celular $\text{CD49f}^H\text{c-Kit}^D\text{CD45}^-$, que disminuye en porcentaje, incrementa positivamente en número absoluto más lentamente según aumenta el tamaño del hígado (desde $6,2 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^5$ células/hígado, aumento de 19 veces).

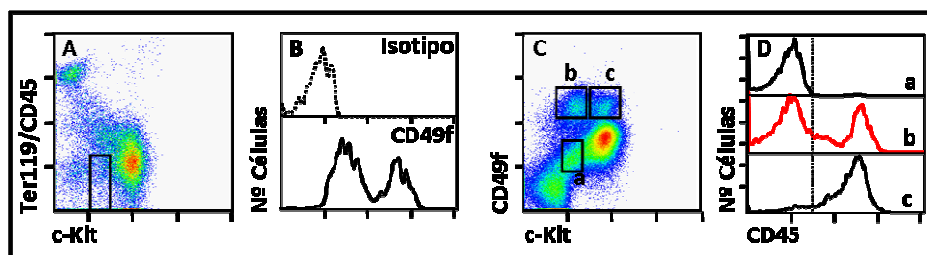


Figura R-1.- Análisis por CT de suspensiones celulares de FL de ratón a E11.5. El dot plot **A)** muestra la expresión de c-Kit y de los marcadores hematopoyéticos Ter119 y CD45. El rectángulo en el plot define la población c-Kit^D de progenitores hepato-epiteliales cuyo patrón de expresión de la integrina CD49f se muestra en el histograma **B)** (arriba en línea discontinua, el control de isotipo, abajo en línea continua CD49f). El dot plot **C)** muestra la tinción correspondiente a CD49f y c-Kit. Los rectángulos en el interior del dot plot definen tres subpoblaciones analizadas para la expresión de CD45 en el histograma **D)**. En éste, la línea vertical discontinua define el límite del control de isotipo. Los histogramas y los dot plots corresponden a un experimento representativo de un total de diez realizados en las mismas condiciones. Las escalas de los ejes de fluorescencias son logarítmicas.

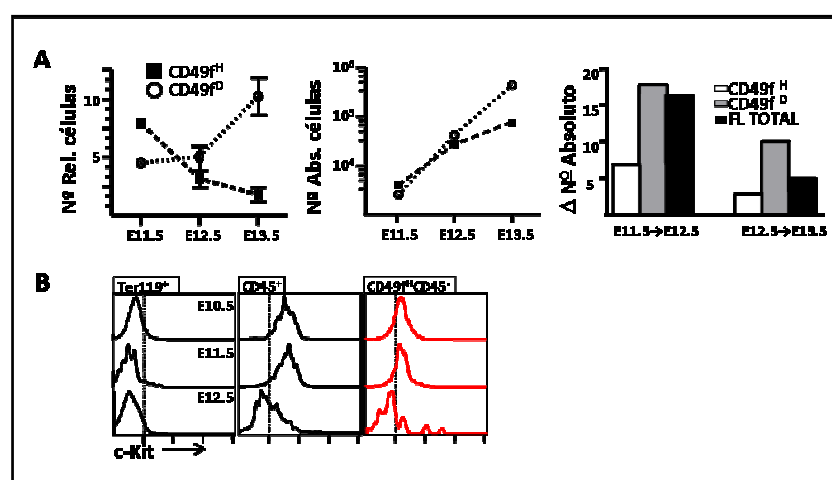


Figura R-2.- Evolución de las poblaciones CD49f^Hc-Kit^D y CD49f^Dc-Kit^D durante la gestación. **A)** Los gráficos (izquierda y centro) representan los números relativos y absolutos por FL de las poblaciones celulares CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ (CD49f^H, cuadrados rellenos) y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ (CD49f^D, círculos vacíos) presentes los días indicados de gestación. Los datos corresponden a la media \pm SEM de 10 experimentos. En el diagrama de barras de la derecha se representa el incremento diario en número absoluto de las células CD49f^H (barras blancas) y CD49f^D (barras grises), y células del FL total (barras negras). **B)** Los histogramas muestran el nivel de fluorescencia del receptor c-Kit presente en las poblaciones celulares indicadas a los días de gestación E10.5, E11.5 y E12.5. Las líneas verticales discontinuas señalan los niveles de fondo encontrados con Acs anti-isotipo. Se muestra un experimento representativo de tres realizados en las mismas condiciones.

El nivel de brillo de la molécula c-Kit desciende en las células CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ de E11.5 a E12.5 indicando la maduración de las mismas (Figura R-2B). Esto también ocurre con otras poblaciones celulares del mismo periodo ontogénico como las células CD45⁺, que reducen el nivel de c-Kit a E12.5, y células del linaje eritroide Ter119⁺, que ya lo han hecho a E10.5, como previamente habíamos descrito (Minguet *et al.*, 2003).

Mediante selección electrónica de las células que muestran nivel elevado o débil de CD49f (Figura R-3A), analizamos la expresión de CD45 en combinación con otras dos moléculas expresadas en células progenitoras, VEGFR2/KDR y la integrina α IIb/CD41 (Figura R-3B-E). Sólo pequeños números de células CD49f^D muestran expresión para KDR o CD41, o son CD45, y prácticamente ninguna co-expresa estos marcadores, lo que se corresponde con un posible fenotipo de progenitor hepático (pHep), que sería CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻KDR⁻ (Figura R-3C, E). Por el

contrario, las células $CD49^H$ son más heterogéneas: alrededor del 40% de ellas presentan únicamente elevados niveles de CD45, siendo negativas para KDR o CD41 (Figura R-3B, D). Una fracción menor de células $CD49^H$ presenta niveles intermedios de CD45 y estas células a su vez son positivas o negativas para KDR y/o CD41 (éste último a bajos niveles), mientras que un gran número de células $CD49^H$ son $CD45^-$ y expresan KDR (30%) o $CD41^{++}$ (42%). Altos niveles de CD41 son propios de MK, mientras que la expresión a bajos niveles es típica de HSCs. Para confirmar ante qué tipo de célula nos encontramos, analizamos moléculas características de células del linaje MK como la tetraspanina CD9 y la cadena GPIb- β (CD42c) del receptor de trombina/vWF, cuya expresión es necesaria para que el complejo del receptor se externalice en membrana y sea efectivo. CD9 se expresa de forma equimolar con CD41 en la población $CD49^H$, y las células más brillantes son además $CD42c^+$, lo que prueba definitivamente el carácter MK de la población $CD49^Hc\text{-Kit}^D CD45^- KDR^+/CD41^H$ (Figura R-3F, G). Al analizar otras integrinas, observamos la co-expresión en células $CD45^- CD41^{++}$ de las cadenas $\alpha 2$ (CD49b/DX5), $\alpha 5$ (CD49e), αL (LFA-1), $\beta 1$ (CD29), $\beta 2$ (CD18) y $\beta 3$ (CD61) (Figura R-4 y Tabla R-1), indicando que en la superficie de estas células a E11.5 se encuentran los receptores completos VLA2, VLA5, VLA6, $\alpha L\beta 2$ y GPIIb/GPIIa (vWFR). Por el contrario no pudimos detectar en las células $CD45^- CD41^{++}$ las cadenas $\alpha 4$ (CD49e), αM (CD11b/Mac-1) y $\beta 4$ (CD104), ni tampoco VCAM-1, FLT3 (CD135) ni CXCR4, y expresan ICAM-1 y el receptor de angiopoyetina 1 (Tie-2) a bajos niveles (Figura R-4 y dato no mostrado).

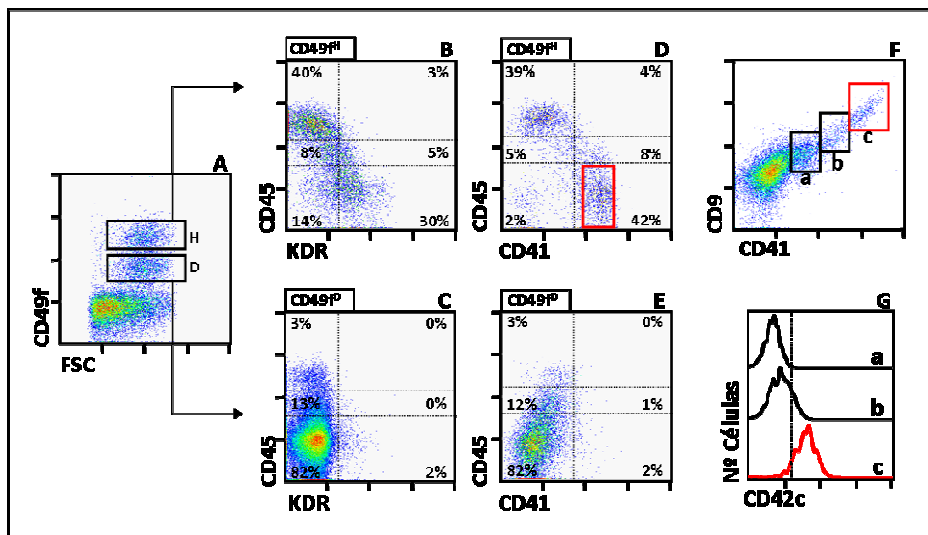
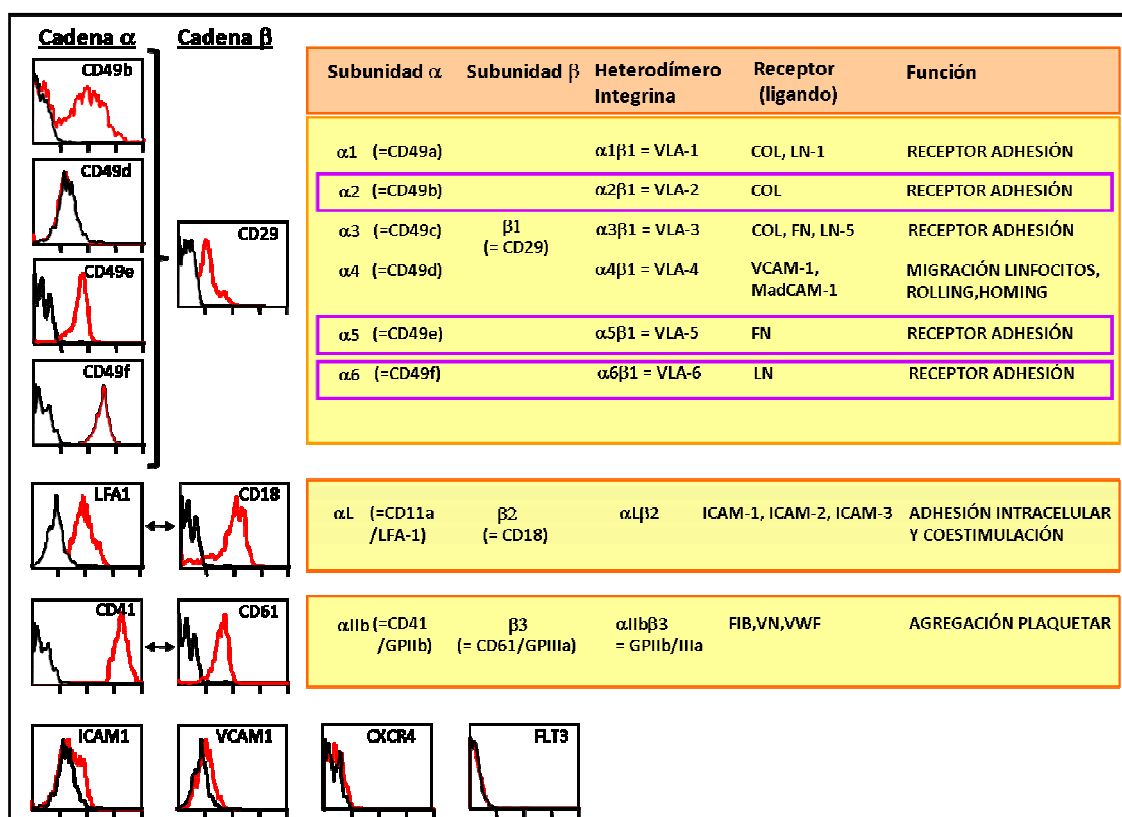


Figura R-3.- Fenotipaje de la población embrionaria $CD49^Hc\text{-Kit}^D$. El dot plot **A)** muestra el patrón de tinción obtenido en células de FL a E11.5 enfrentando FSC versus CD49f. Los dos rectángulos indican las subpoblaciones $CD49^H$ y $CD49^D$ que son analizadas para la expresión de CD45 frente a KDR (dot plots **B** y **C**) y CD41 (dot plot **D** y **E**), respectivamente. Las líneas discontinuas en los dot plot definen diferentes niveles de expresión de cada marcador, y los números dentro de cada región indican los porcentajes de células correspondientes. El rectángulo rojo en **D)** identifica la población $CD49^Hc\text{-Kit}^D CD45^- CD41^{++}$. El dot plot **F)** muestra los niveles de expresión de CD9 y CD41 en células de FL a E11.5. Las tres subpoblaciones identificadas en los rectángulos dentro del plot son analizadas para la expresión de CD42c en los histogramas en **G)** (control de isotipo en línea discontinua vertical). Los datos son representativos de al menos 5 experimentos similares.



2.- PRESENCIA DE PROGENITORES DE MKs EN NICHOS HEMATOPOYÉTICOS EMBRIONARIOS.

Una vez definida la población CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻KDR⁺/CD41⁺CD9⁺CD42c⁺ como pMKs, nos planteamos trazar su aparición a E10.5 y E11.5 en FL y en otros nichos hematopoyéticos, como son el YS, la AGM y las PBLs, y analizar su fenotipo de forma más completa. En primer lugar, comprobamos que en todas las localizaciones existe una población CD45⁻CD41⁺ ya desde E10.5 (población R3, Figura R-5). Además, la presencia de CD45 y CD41 permite definir otras dos subpoblaciones celulares (R1:CD45⁺CD41⁻, R2:CD45⁺CD41⁺), por lo que en todas ellas analizamos la expresión diferencial de otros marcadores. La población CD45⁻CD41⁺ (histogramas en rojo) muestra una expresión baja de c-Kit, es negativa para CD93, CD105 y CD48 (excepto en células de FL a E11.5, que presentan una baja expresión de CD105 y bajos números de CD48), y es positiva para CD31, CD49f, KDR (con un nivel más elevado a E11.5), CD9 y CD42c. El nivel de CD41 en las células CD45⁻CD41⁺ se incrementa desde E10.5 a E11.5 en el YS (MFI de 176±39 a E10 y 320±53 a E11.5, p<0,05; n=20), probablemente indicando un estadio de maduración más avanzado, que no se acompaña con un incremento en el nivel de brillo de CD42c. Por el contrario, las poblaciones celulares R1 y R2 son negativas para CD42c en todos los órganos analizados a E10.5 y E11.5, aunque son positivas para c-Kit, CD31, CD49f y CD9, y contienen fracciones de células CD93⁺

(AA4.1) y CD48⁺. La expresión de CD105 y KDR en estas subpoblaciones es variable: CD105 es negativo en la población R1 de YS y PBL a E10.5 y E11.5, y en AGM a E11.5, mientras que es positiva en la población celular R2 en todos los órganos, y KDR es también negativo en las células R1 en AGM y FL a E11.5, y en YS y PBL en la población R2.

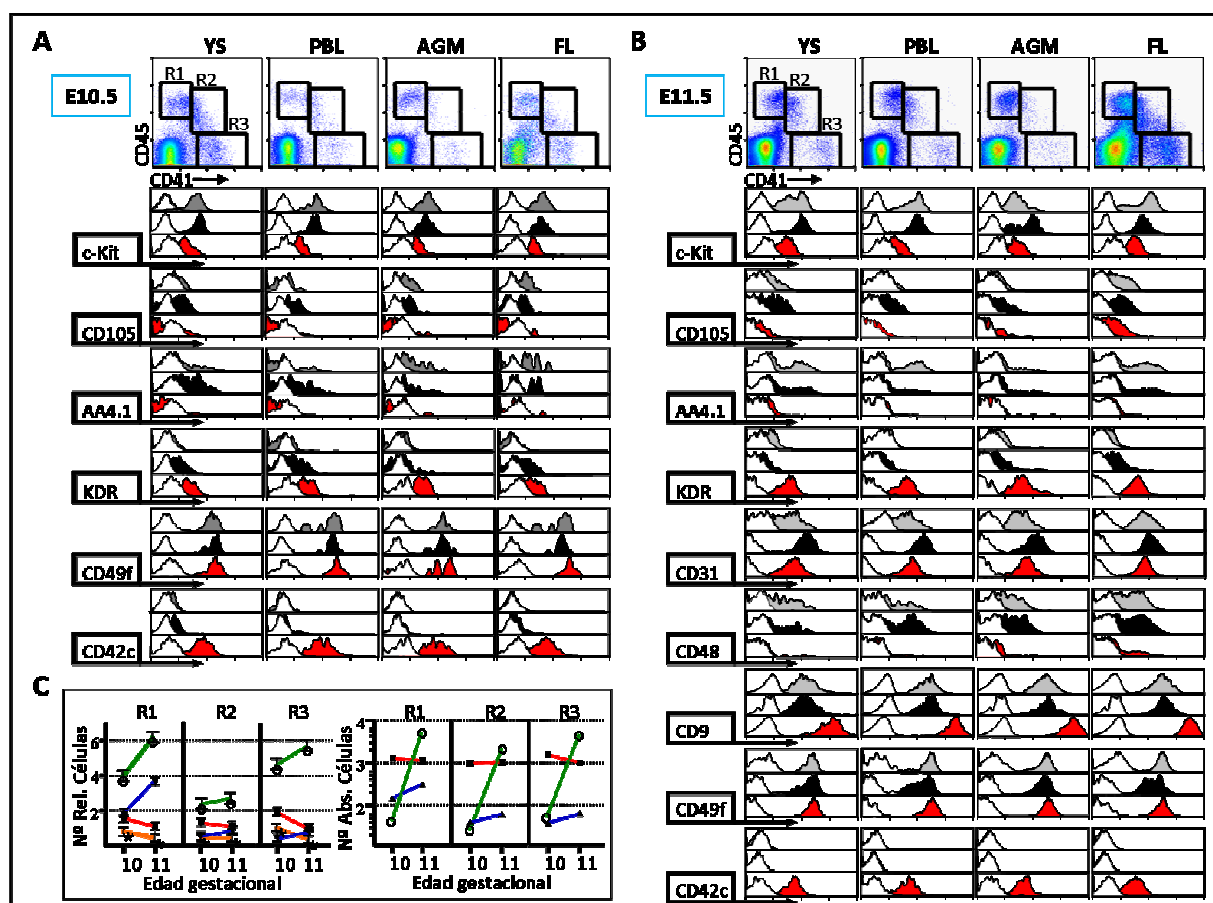


Figura R-5.- Caracterización por CT de la población pMK presente en diferentes localizaciones en E10.5 y E11.5, en suspensiones celulares de YS, PBL, AGM y FL. A y B) Los dot plots mostrados en la fila superior muestran el patrón de tinción encontrado para CD45 versus CD41. Los rectángulos dibujados en el interior definen las subpoblaciones (R1, R2, R3) analizadas para la expresión de los marcadores indicados a la izquierda en los histogramas de la parte inferior de la figura. R1, histogramas grises, R2, histogramas negros y R3, histogramas rojos. Superpuestos en blanco en cada histograma se muestran los resultados obtenidos con Acs irrelevantes. Los histogramas y los dot plots corresponden a un experimento representativo de un total de cinco realizados en las mismas condiciones. Las escalas de fluorescencia son logarítmicas. **C)** Los gráficos representan los números relativos y absolutos (por órgano) de las células contenidas en las regiones R1, R2 y R3 a E10.5 y E11.5 en el YS (cuadrados, línea roja), AGM (triángulos, línea azul), PBL (estrellas, línea naranja) y FL (círculos, línea verde). Los números son la media \pm SEM de cinco experimentos diferentes. Las líneas discontinuas horizontales prolongan las principales divisiones marcadas en el eje de ordenadas (lineal para los números relativos, logarítmica para los números absolutos).

Por tanto, identificamos pMK definidos como $CD49f^H c\text{-Kit}^D CD45^- KDR^+ / CD41^{++} CD9^+ CD42c^+$ en YS, PBL, AGM y FL tanto a E10.5 como E11.5. Aquellos presentes en FL tienen un fenotipo más inmaduro, pues todavía expresan CD105, y tienen significativamente mayores niveles de c-Kit y menores niveles de CD41 y CD42c (Tabla R-2). La cuantificación del número de células presentes en las tres subpoblaciones aquí analizadas, muestra un aumento exponencial en el número de células de todas las subpoblaciones en FL entre E10.5 y E11.5, mientras que tanto en AGM como en YS, las células apenas mantienen sus números (Figura R-5C).

$CD41^H CD45^-$	YS	PBL	AGM	FL	YS vs FL
CD41	320 ± 53	369 ± 23	306 ± 48	212 ± 19	**
CD42c	69 ± 14	60 ± 11	33 ± 8	27 ± 5	*
c-Kit	30 ± 0.6	30 ± 0.5	40 ± 1	70 ± 1	*

Tabla R-2.- Valores de MFI ± SEM (n=5) obtenido con los Acs indicados a la izquierda, sobre la población $CD45^- CD41^{++}$ (Región R3 en la Figura R-5) en las distintas localizaciones hematopoyéticas a E11.5. A la derecha aparece el nivel de significación al comparar los valores obtenidos para células procedentes del YS frente a los de células del FL (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

3.- DIFERENCIACIÓN DE pMKs EN EL HÍGADO A E11.5.

Para definir las vías de diferenciación de las subpoblaciones identificadas en el hígado de E11.5, las purificamos por FACS y realizamos cultivos en medio líquido a corto plazo. Tras 36/48 horas en ausencia (Figura R-6 y R-7A, C) o en presencia de TPO, fotografiamos los cultivos, sacamos las células de las placas, las contamos y las teñimos con diversos Acs. Los resultados obtenidos por CT indican que:

A.- Los progenitores hematopoyéticos $CD45^{++} CD41^- KDR^-$ originan un alto porcentaje de células con niveles intermedios de CD45 y $CD42c^+$, que pueden ser $c\text{-Kit}^- CD31^+ CD41^{++}$ o $c\text{-Kit}^+ CD31^+ CD41^+$. Estas células $CD42c^+$ son negativas para Mac-1. El resto de células presentes en estos cultivos son de tipo mielóide $CD45^{++} CD42c^-$ con distinto grado de maduración: casi la mitad de las células son $c\text{-Kit}^{++} Mac-1^+$, y alrededor de un tercio son $c\text{-Kit}^- Mac-1^{++}$ (Figura R-6A). No se detectan células $Ter119^+$ a E11.5 en estas condiciones.

B.- Los cultivos derivados de células $CD45^+ CD41^- KDR^-$ muestran un mayor grado de heterogeneidad, detectándose diversas subpoblaciones celulares: 1) fracciones muy significativas de células $CD42c^+$, que expresan CD45 de forma variable, desde niveles intermedios hasta ser completamente negativas. Estas células $CD42c^+$ a su vez son más inmaduras $c\text{-Kit}^+ CD31^+ CD41^+$ o más diferenciadas $c\text{-Kit}^- CD31^+ CD41^{++}$ (Figura R-6B); 2) bajos números de células $CD45^{++}$, que son mayoritariamente células mieloides inmaduras $c\text{-Kit}^{++} Mac-1^+$; 3) algunas células permanecen como $CD45^+ Mac-1^- CD41^+ CD42c^-$; y 4) se detectan células $Ter119^+$, indicando que existe una capacidad

significativa de diferenciación hacia el linaje eritroide, dato que concuerda con la presencia de células con bajo FSC/SSC entre las células recuperadas en los cultivos.

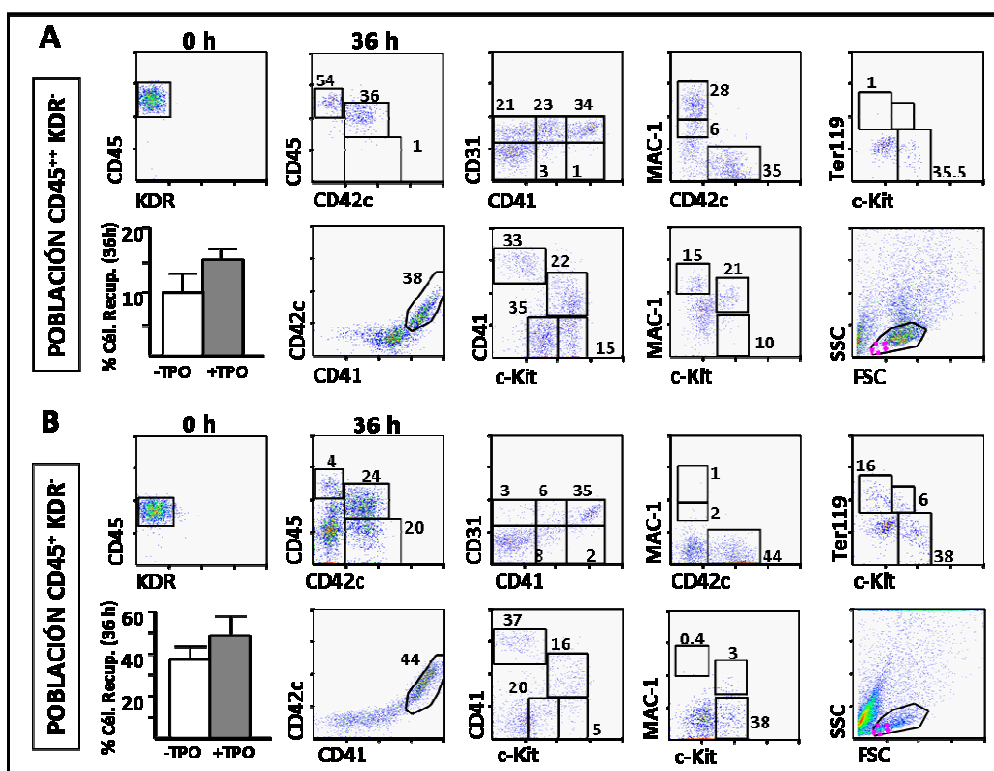


Figura R-6.- Diferenciación *in vitro* de las poblaciones celulares CD45⁺KDR⁻ y CD45⁺KDR⁺. Las poblaciones celulares CD45⁺KDR⁻ (A) y CD45⁺KDR⁺ (B) fueron purificadas por FACS y cultivadas en medio líquido sobre soportes de plástico. Tras 36 horas, las células fueron recuperadas y analizadas mediante CT. El dot plot en la línea superior (izquierda) muestra la pureza de las poblaciones tras la purificación (tiempo 0). Los gráficos de barras en la línea inferior (izquierda) representan el porcentaje de células recuperadas tras 36 horas de cultivo, en ausencia o presencia de TPO (media \pm SEM, n=5). Los restantes dot plot muestran los resultados obtenidos a las 36 horas. En el dot plot FSC/SSC (abajo derecha) los rectángulos rojos destacan la presencia o ausencia de células con bajo FSC/SSC (eritrocitos más maduros), y el área definida por la línea negra, las células analizadas. Los rectángulos y la elipse en los dot plot definen diferentes subpoblaciones y los números sobre ellas representan los porcentajes de células en cada subpoblación. Los dot plot mostrados son representativos de cuatro experimentos diferentes.

C.- Los cultivos de células CD45⁺CD41⁺⁺CD31⁺KDR⁺ (Figura R-7A) diferencian preferencialmente hacia células c-Kit⁻CD41⁺⁺CD42c⁺, que expresan o no bajos niveles de CD45. Para descartar que el descenso en el nivel de brillo de CD45 observado en los pMKs CD42c⁺ identificados en los cultivos de las tres subpoblaciones CD45⁺, se debiera a algún artefacto ocasionado por los Acs anti-CD45 utilizados en la purificación, repetimos los experimentos purificando las células en función de la expresión de CD31 y KDR, que como se muestra en la Figura R-5 identifica células c-Kit^DCD45⁺CD41⁺⁺. De nuevo en estos cultivos observamos una disminución en la expresión de CD45 (Figura R-7B), que no es consecuencia de un aumento de la mortalidad de estas células, ya que en

cultivos en paralelo de células $CD45^+$ extraídas de un ratón GFP^+ , baja la expresión de $CD45$ mientras que se mantienen los números de células GFP^+ a lo largo del cultivo.

D.- Por último en los cultivos realizados con progenitores $CD49f^H c\text{-Kit}^D CD45^-$ $CD41^{++} CD31^+ KDR^+$ se encuentran únicamente células $c\text{-Kit}^- CD45^- CD42c^{++} CD41^{++}$, con menor expresión tanto de la integrina $CD49f$ como de KDR tras 36 horas (Figura R-7C). En estos cultivos y en los de células $CD45^+ CD41^{++} CD31^+ KDR^+$, no se identifican células $Mac-1^+$ o $Ter119^+$ (no mostrado).

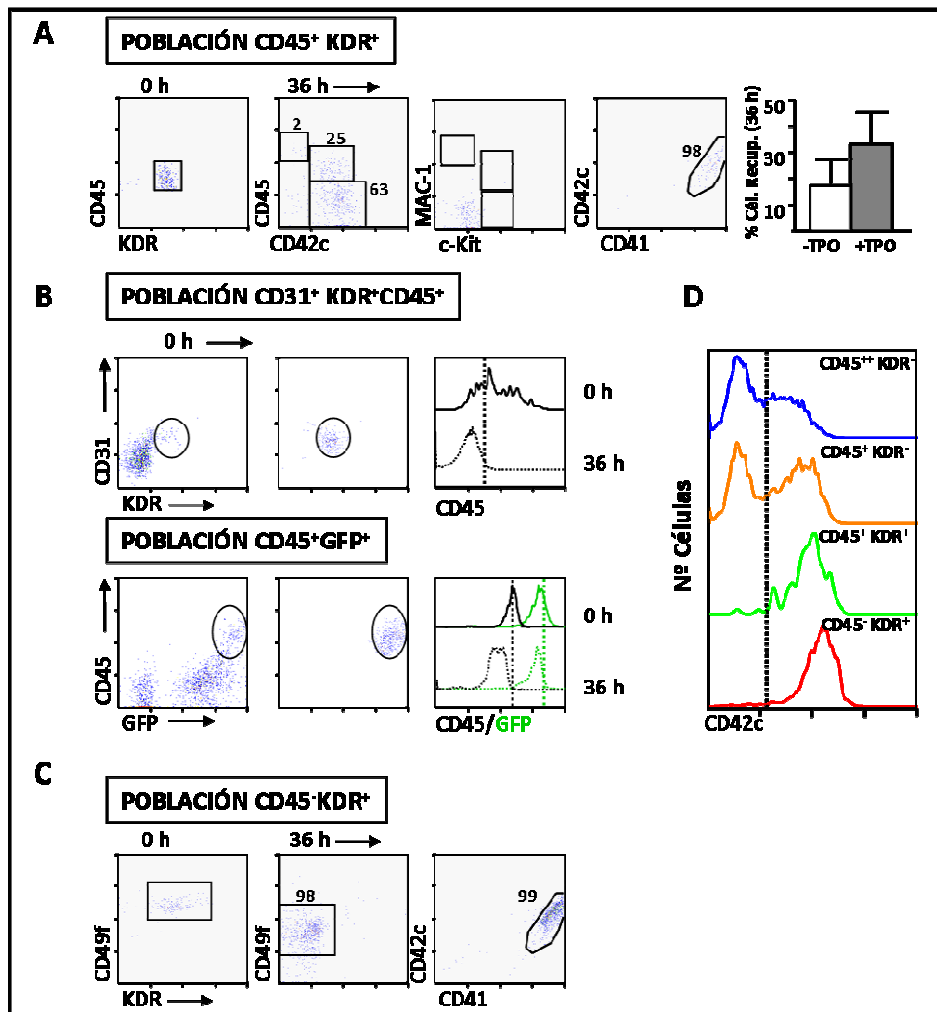


Figura R-7.- Diferenciación *in vitro* de las poblaciones celulares $CD45^+KDR^+$ y $CD45^-KDR^+$. Se muestran los resultados obtenidos con las poblaciones celulares indicadas, según se resume en la Figura R-6.) **A)** Población $CD45^+KDR^+$. **B)** Población $CD45^+KDR^+CD31^+$ y **C)** Población $CD45^-KDR^+$. Los dot plot de la izquierda en **B)** muestran la tinción de células de FL a E11.5 con $CD31/KDR$ (plots superiores) y $CD45/GFP$ (plots inferiores), antes (izquierda) y después (derecha) del proceso de purificación (elipses en el interior de los plots). Los histogramas a la derecha representan la tinción de $CD45$ y $CD45/GFP$ a tiempo cero y tras 36 horas de cultivo. **D)** Los histogramas representan el nivel de expresión de $CD42c$ tras 36 horas de cultivo, en las 4 subpoblaciones indicadas. La línea de puntos indica el nivel de fondo encontrado con Acs irrelevantes. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Es interesante resaltar, que aunque se detectan células $CD42c^+$ entre las células derivadas de las cuatro subpoblaciones analizadas, su nivel de brillo aumenta progresivamente desde la población $CD45^{++}KDR^-$ a la población $CD45^-KDR^+$ (Figura R-7D).

El potencial de diferenciación *in vitro* de estas subpoblaciones se ve también reflejado en las diferentes morfologías exhibidas por las células en cultivo (Figura R-8). Tras 48 horas, la mayoría de células procedentes de cultivos $CD45^-KDR^+$ tienen un cuerpo pequeño y largas extensiones citoplásmicas tipo neurita, similares a las proPTs que han sido descritas como características de células pMKs en cultivos con TPO (Patel *et al.*, 2005). Además se observan células que se adhieren al sustrato y otras células con una morfología alargada y fusiforme que recuerda a la de un gusano ("Worm-like", WL). Tras las primeras 24 horas de cultivo, un gran porcentaje de estas últimas células presenta movimiento que puede ser seguido a tiempo real por el observador (vídeo 1 y 1B en el material suplementario). Este movimiento es dependiente de la temperatura, ralentizándose a temperatura ambiente, y llegando incluso a desaparecer. En los cultivos de progenitores $CD45^+KDR^+$ podemos apreciar células con morfología similar a la exhibida por pMK y WL, aunque en menor número. Por el contrario, las células con morfología típica de pMK o WL representan una población minoritaria o ausente en los cultivos de células $CD45^+KDR^-$ y $CD45^{++}KDR^-$, respectivamente. La adición de TPO a estos cultivos no produce cambios significativos en los tipos celulares obtenidos, aunque el número de células recuperadas en cultivos tratados con TPO aumenta ligeramente (de 1,5 a 2 veces; Figuras R-6 y R-7A), y el radio de las células es significativamente mayor al de las mismas células en ausencia de TPO (media \pm SEM de células KDR^+ , $14,9 \pm 0,9$ con TPO *versus* $9,0 \pm 0,3$ sin TPO, $p < 0,001$; $n=15$). Los cultivos realizados a partir de subpoblaciones celulares purificadas de YS10.5, FL10.5, YS11.5 y FL12.5 muestran resultados semejantes (Figura R-9; sólo se muestran resultados referentes a CT).

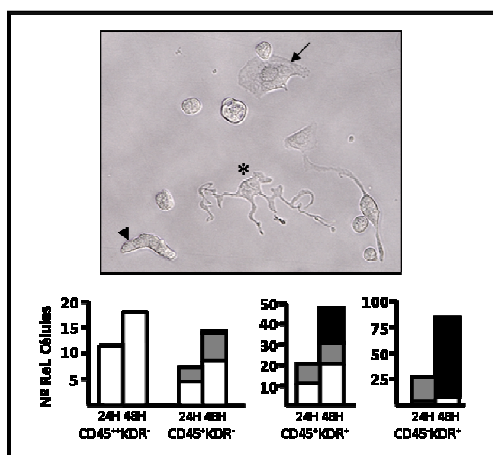


Figura R-8.- Morfologías adoptadas por la población $CD45^+KDR^+$ en cultivo. Microfotografía representativa de un cultivo de células $CD45^+KDR^+$ tras 36 horas de cultivo. Se identifican células con diferente morfología: la flecha apunta a una célula adherente (ADH), la punta de flecha a una célula WL, y la estrella a una célula formadora de proPTs (pMK). Los gráficos de barras muestran los números relativos de células con diferentes morfologías encontradas a 24 y 48 horas en cultivo, a partir de las poblaciones celulares que se indican (media \pm SEM). En blanco, células ADH, en gris células WL, en negro, células pMK. El recuento fue llevado a cabo por dos observadores independientes, con un objetivo de 40 aumentos ($n=100$ campos, 2500 células contadas).

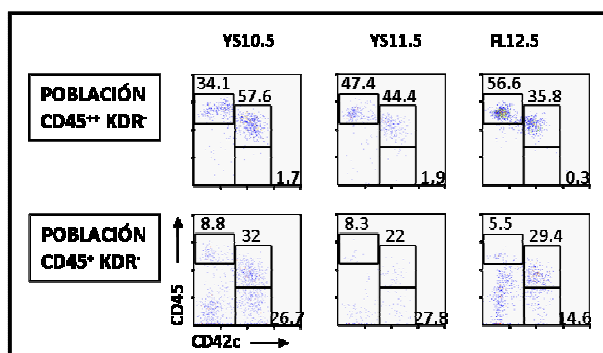


Figura R-9.- Diferenciación *in vitro* de las poblaciones CD45⁺KDR⁻ y CD45⁺KDR⁺. Se muestra los resultados obtenidos con las poblaciones celulares CD45⁺KDR⁻ y CD45⁺KDR⁺ purificadas a partir de YS10.5, YS11.5 y FL12.5. Los datos se presentan según se indica en la Figura R-6.

El potencial de diferenciación de las poblaciones purificadas procedentes de YS y FL a E10.5 y de FL a E11.5, se analizó también en cultivos en medio semisólido (Methocult-3434®). Los resultados muestran que a E10.5 las células CD45⁺CD41⁻ tienen el mayor potencial para originar colonias GM (CFU-GM) (Figura R-10, panel superior). El mayor número de células presentes en el FL a E11.5, y la mejor definición de sus subpoblaciones celulares, permitió purificarlas de forma más precisa (Figura R-10, panel inferior). Al analizarlas según su capacidad de generar colonias *in vitro*, comprobamos que la mayor actividad CFU-GM se encuentra en las células que expresan niveles intermedios de CD45, tanto en aquellas que co-expresan CD41 y KDR como en las que no. El potencial de las células hematopoyéticas más maduras CD45⁺CD41⁻KDR⁻ y los pMK CD45⁻CD41⁺KDR⁺ fue bajo incluso tras añadir TPO, lo que produjo un aumento en los números de CFU-GM en todas las poblaciones analizadas. Cabe destacar asimismo que el número de células/colonia en la población CD45-CD41⁺ fue bajo (<50), y que frecuentemente eran células de gran tamaño y con morfología de pMK, incluso con proPTs, por lo que se corresponderían con CFU-MK.

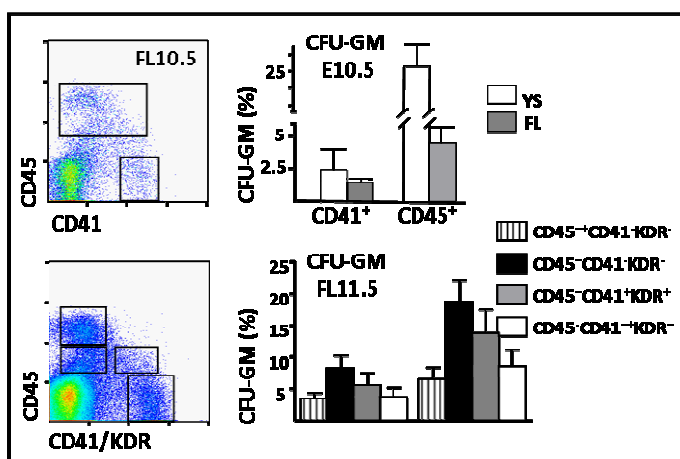


Figura R-10.- Análisis del potencial de diferenciación de las células de YS y FL. En el dot plot de la izquierda se muestra la tinción de células obtenidas a E10.5 (de YS y FL, arriba) y a E11.5 (FL, abajo), teñidas con CD45 y CD41 y CD45 y KDR, respectivamente. Los rectángulos interiores definen las poblaciones que se purificaron por FACS y se sembraron en Methocult 3434®. Las colonias presentes en ellos se contaron a día 7 por dos observadores independientes. Los gráficos de barra muestran el número de colonias CFU-GM identificadas por cada 100 células sembradas (media \pm SEM de tres experimentos independientes).

4- LOS pMKs PRESENTES EN EL FL A E11.5 EXHIBEN UNA EXPRESIÓN ANÓMALA DE PROTEÍNAS HEPATO-EPITELIALES Y ENDOTELIALES.

El análisis de la morfología y el patrón de expresión de diversas proteínas en pMKs obtenidos *ex vivo* de FL11.5, se llevó a cabo en un primer paso mediante tinciones convencionales como HE y Giemsa sobre preparaciones de células CD49f⁺Kit^DCD45⁻KDR⁺ purificadas (Figura R-

11A, B). Esto ha permitido identificar un número elevado de células binucleadas, y en ocasiones multinucleadas. En algunas células se observa la presencia de elongaciones citoplásmicas, incluso tras el estrés mecánico producido por el proceso de purificación mediante FACS. Estas elongaciones se observan más claramente en preparaciones de células de FL11.5 sin purificar y depositadas sobre portaobjetos, al teñir con un Ac anti-CD41 (Figura R-11 C-D). Las células purificadas $CD49f^H$ - Kit^D $CD45^-KDR^+$ fueron teñidas sobre los portas con diversos Acs. En primer lugar analizamos la expresión del vWF, que aparece en forma de un punteado citoplasmático, típico de células endoteliales y de células ya comprometidas hacia el destino MK (Figura R-11 E-F). Los datos obtenidos por CT en pMKs de FL11.5 sobre la expresión de CD31 y KDR (que son característicos de células endoteliales) y el hecho de que los pMKs de adulto comparten diversos marcadores con HSCs (Buza-Vidas *et al.*, 2006; Huang y Cantor, 2009), nos llevaron a analizar en estas células la expresión de otras proteínas, como es la nestina, un filamento intermedio típicamente expresado por células tronco neuronales y por células endoteliales durante procesos de angiogénesis.

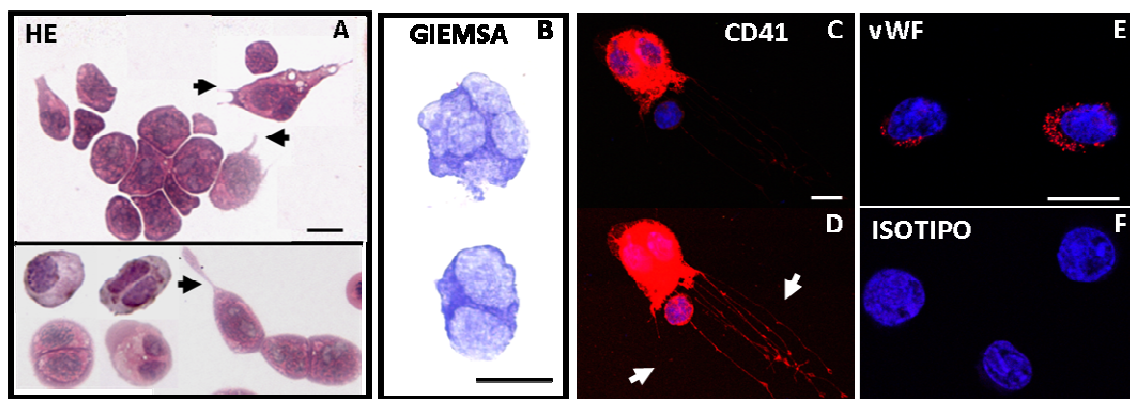


Figura R-11.- Caracterización *ex vivo* de células hepáticas $CD49f^H$ a E11.5. Las microfotografías de campo claro muestran células $CD49f^H$ depositadas sobre portaobjetos y teñidas con HE **A)** y con Giemsa **B)**. Las flechas negras resaltan la presencia de pequeñas prolongaciones citoplásmicas y extensiones pseudopodiales. Las microfotografías de la derecha **(C y D)** muestran dos exposiciones de una preparación de células de FL11 (sin purificar), teñidas con el Ac anti-CD41, y células purificadas $CD49f^H$ teñidas con anti- vWF **(E)**, y con un Ac irrelevante **(F)**. Nótese la presencia de largas y finas extensiones citoplásmicas (flechas blancas). La señal específica del los Acs se muestra en rojo, y los núcleos aparecen teñidos de azul (TOPRO-3). Las barras de escala representan 10 μ m. Se muestran microfotografías representativas de tres experimentos.

La población de células pMK $CD49f^H$ - Kit^D $CD45^-KDR^+$, y no los progenitores $CD49f^D$ - Kit^D $CD45^-KDR^-$, expresan esta proteína (Figura R-12). Por otra parte, en el estudio previo realizado con la población total de progenitores $c\text{-Kit}^D$ $CD45^-Ter119^-$, que contiene a los pMK ($CD49f^H$ KDR^+), habíamos observado que toda la población expresaba ALB *ex vivo* (Minguet *et al.*, 2003). Confirmamos este resultado mediante tinción con un Ac anti-ALB sobre las células $CD49f^H$ -

Kit^DCD45⁻KDR⁺, observando expresión positiva de ALB en el citoplasma de los pMK, aunque en menor intensidad que en células purificadas CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻KDR⁻ (Figura R-12).

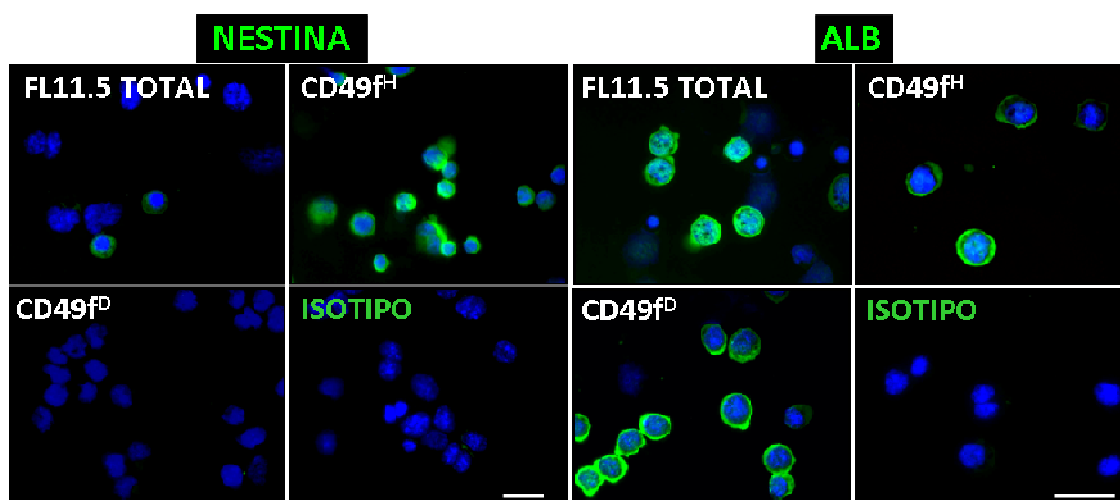


Figura R-12.- Expresión *ex vivo* de nestina y ALB en células CD49f^H y CD49f^D. Inmunodetección de nestina (paneles izquierdos) y ALB (paneles derechos) y sus respectivos Acs irrelevantes, llevadas a cabo sobre células CD49f^H y CD49f^D (E11.5) purificadas y depositadas sobre portaobjetos. La señal específica de los Acs se muestra en verde; los núcleos están contrastados con TOPRO-3 (azul). Las barras de escala representan 20 μ m. Experimento representativo de tres.

Sin embargo, los MK adultos pueden adquirir diversas proteínas del medio externo mediante mecanismos de endocitosis/pinocitosis (Handagama *et al.*, 1989). Este hecho nos ha llevado a realizar análisis mediante PCR semi-cuantitativa para verificar la expresión de ARN mensajero en células sin purificar de FL11.5 y YS11.5, sobre células purificadas pMK CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻KDR⁺, sobre células mieloides CD45⁺ y sobre progenitores pHep CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻KDR⁻ de FL a E11.5, y sobre otros tejidos adultos, incluyendo MK inmaduros aislados de BM (iMK) (Figura R-13 A, B). En primer lugar, los resultados confirman una gran expresión para vWF y la cadena GPIIb α de su receptor entre las células CD49f^H comparado con las células CD49f^D, así como también su expresión en tejidos de E11.5 y BM sin purificar, mientras que en los iMK de BM no detectamos expresión de vWF. Los transcritos de VEGFR-2 (KDR) son positivos, a diferentes niveles, en todas las muestras analizadas, como también lo son los de las cuatro isoformas detectadas de su ligando VEGF-A, a excepción de las muestras de YS11.5 y iMK (Figura R-13 A). En segundo lugar, el análisis del patrón de expresión de los filamentos intermedios nestina y vimentina, muestra una expresión restringida de nestina a la población CD49f^H así como a las muestras de FL11.5 y riñón, mientras que la expresión de vimentina es positiva en la mayoría de muestras analizadas. Finalmente, diversos transcritos hepato-específicos (Figura R-13 B), entre los que se encuentran ALB, AFP y TTR son expresados en células aisladas pMK CD49f^H, aunque a un nivel 20 veces menor que el encontrado en células de la población CD49f^D, como determinamos mediante PCR-TR para la ALB

(Figura R-13 C). Esta anómala expresión de ALB en pMKs se restringe a los presentes en el FL11.5, ya que no se detecta en muestras de pMK aisladas de otras localizaciones a E11.5 o en iMK de adulto (Figura R-13 D). En resumen, los pMK de FL11.5 muestran características compatibles con MK inmaduros y, a diferencia de otros pMK de origen embrionario o con iMK de BM adulta, presentan una expresión aberrante de proteínas de los linajes endotelial y hepato-epitelial.

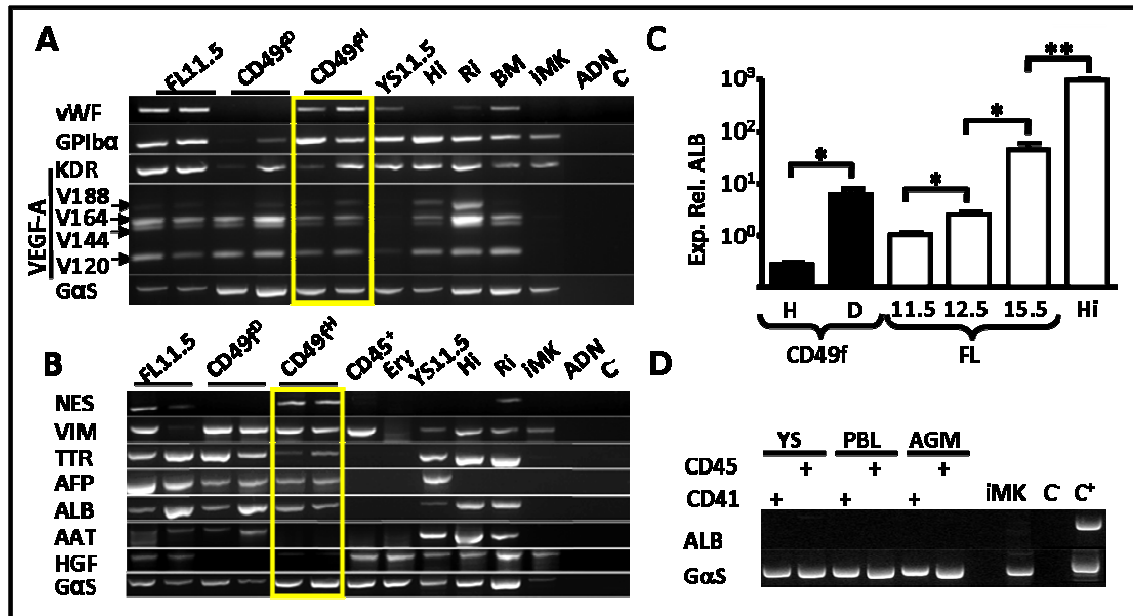


FIGURA R-13.- Expresión de genes específicos de MKs, células endoteliales, de filamentos intermedios y de células del linaje hepato-epitelial. La expresión de los genes indicados se realizó por PCR semicuantitativa a partir de preparaciones de células totales de FL11.5, YS11.5, hígado adulto (Hi), riñón (Ri), médula ósea total (BM) y preparaciones purificadas por FACS de precusores megacariocíticos de BM ($CD41^H CD9^H c\text{-Kit}^H$, iMK), células $CD45^+$ y $Ter119^+$ (eritrocitos, Ery) de FL11.5, y ADN genómico. C⁻, control negativo (agua). Los productos de las PCRs se separaron electroforéticamente en geles de agarosa, de los que se muestran uno representativo de tres en las mismas condiciones. Los resultados de la población $CD49f^H$ pMK aparecen resaltados mediante el recuadro amarillo. La expresión del gen $G\alpha S$ se utiliza como referencia del ARNm total por muestra. En **A**) se muestran los resultados de genes específicos de MK y células endoteliales (vWF, GPIb α , cuatro isoformas del gen VEGF-A – V188, V164, V144 y V120 –). En **B**) los genes de filamentos intermedios y hepato-epiteliales (VEGF-A, NES, nestina; VIM, vimentina). En **C**) se muestra la cuantificación relativa de la expresión de ALB hallada mediante PCR-TR, realizada sobre muestras de células purificadas $CD49f^H$ (H) y $CD49f^D$ (D) de FL11.5, y sobre células totales de FL11.5, FL12.5, FL15.5 e hígado adulto (Hi). La expresión específica de ALB fue calculada mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los valores fueron normalizados con el gen control $G\alpha S$, y los valores obtenidos para las células de FL11.5 se usaron como referencia. Se muestran medias \pm SEM de los resultados de 10 muestras independientes. La significación estadística fue determinada usando el test *t* Student (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). **D**) Gel correspondiente a la detección de ALB por PCR semicuantitativa en preparaciones de células purificadas $CD45^+$ y $CD41^+$ de YS11.5, PBL11.5 y AGM11.5. iMK, precusores megacariocíticos de BM identificados como en los paneles **A** y **B**; C⁻, control negativo; C⁺, control positivo (células sin purificar de FL11.5).

5.- LOS pMKs DE E11.5 DIFERENCIAN ESPONTÁNEAMENTE *IN VITRO* Y EMITEN PROPLAQUETAS.

El siguiente paso fue seguir a lo largo del tiempo los rápidos cambios morfológicos que sufren en cultivo, incluso en ausencia de TPO, las células purificadas $CD49f^H c\text{-Kit}^D CD45^- KDR^+$ de FL11.5. Al inicio de los cultivos la mayoría de células tienen forma esférica y no están adheridas (Figura R-14A). Tras 6 horas de cultivo, algunas células comienzan a adherirse a las placas de cultivo, y 18 horas más tarde, algunas empiezan a transformarse en células tipo WL altamente

móviles, cuyo cuerpo mide entre 3 y 12 cuerpos celulares iniciales, alcanzando un tamaño de hasta 180 μm (media \pm SEM = 103,6 \pm 6,8 μm ; n=30) (Figura R14-B y vídeos complementarios). Ya a este tiempo, son visibles bajos números de células con dos o tres extensiones citoplasmáticas pseudopodiales, que se convierten en la población mayoritaria tras 48 horas de cultivo, aunque todavía en ese momento los cultivos son asincrónicos y contienen células en diferentes estados de diferenciación (Figura R-14C, D). Las extensiones pseudopodiales que forman las proPTs son de longitud similar independientemente de la matriz extracelular utilizada para cubrir los portaobjetos (media \pm SEM = 272 \pm 16,9 μm de longitud, rango= 169,8 a 389,49 μm en el caso de fibronectina, y 243,5 \pm 25,9 μm de longitud, rango=145,1 a 516,8 μm para el colágeno I). Las proPTs son poco ramificadas, y muestran los característicos abultamientos intermedios a lo largo del filamento proplaquetar, con un abultamiento final o “tip” (Figura R-14D). Es difícil cuantificar el número medio de proPTs/célula, pero parece que no es más de cinco, incluso tras 6 días en cultivo (dato no mostrado). El cultivo sobre placas cubiertas con colágeno I, laminina o fibronectina induce un aumento en la adherencia de las células, efecto también producido por la adición de TPO al medio de cultivo (Figura R-14 B, C, H y dato no mostrado).

Para obtener una visión más detallada de algunas estructuras presentes en estos cultivos asincrónicos llevamos a cabo inmunofluorescencias sobre células pMK en proceso de diferenciación. En primer lugar realizamos una tinción con dos colores para los Acs anti-CD41 y anti-CD42c, para verificar si las células que presentan formación de proPTs y aquellas móviles de aspecto fusiforme eran el mismo tipo celular en diferente estadio de maduración. Ambos tipos celulares expresan CD41 y CD42c y contienen uno (WL) o dos núcleos (WL y pMK). Por último, el seguimiento de los cultivos en tomas fotográficas secuenciales (“time-laps”) demuestra que el fenotipo fusiforme WL es un estadio previo en la formación de MKs que emiten proPTs (ver vídeo 2 y figura R-14 F, G).

Por otra parte, la tinción con anti-CD41 y faloidina (que marca actina-F) muestra diferentes patrones de expresión: a) algunas células adherentes presentan un punteado de CD41, que co-localiza con actina-F en estructuras que recuerdan a los podosomas presentes en células hematopoyéticas, entre las que destacan los MK (Figura R-15 A); b) las células que forman proPTs muestran tinción de CD41 y actina-F en la membrana e interior del filamento respectivamente, con la actina-F concentrada preferentemente en los abultamientos intermedios (Figura R-15 B); c) algunas células también presentan un acúmulo intracitoplásmico brillante y homogéneo de CD41, que co-localiza con actina-F, y extensiones microcitoplásmicas débilmente teñidas con CD41 (Figura R-15 B-D), d) por último, en otras células el CD41 se acumula principalmente en las membranas, formando dos anillos externos entre los que se encuentra la actina-F, recordando al DMS, que precede a la formación de la proPTs (Patel-Hett *et al.*, 2008) (Figura R-15 E). La dependencia de la polimerización de actina en el proceso de formación de las proPTs se evidencia por la inhibición de

este proceso al añadir al inicio del cultivo citocalasina B al medio (Figura R-15 F-F''): las células presentes a las 48 horas en estos cultivos no desarrollan proPTs y la glicoproteína GPIIb (CD41) se acumula en el citoplasma independientemente de actina-F, manteniendo la viabilidad celular. Finalmente, comprobamos que la expresión *ex vivo* de nestina y ALB en pMK diferenciados se mantiene tras 48 horas en cultivo (Figura R-15 G-I).

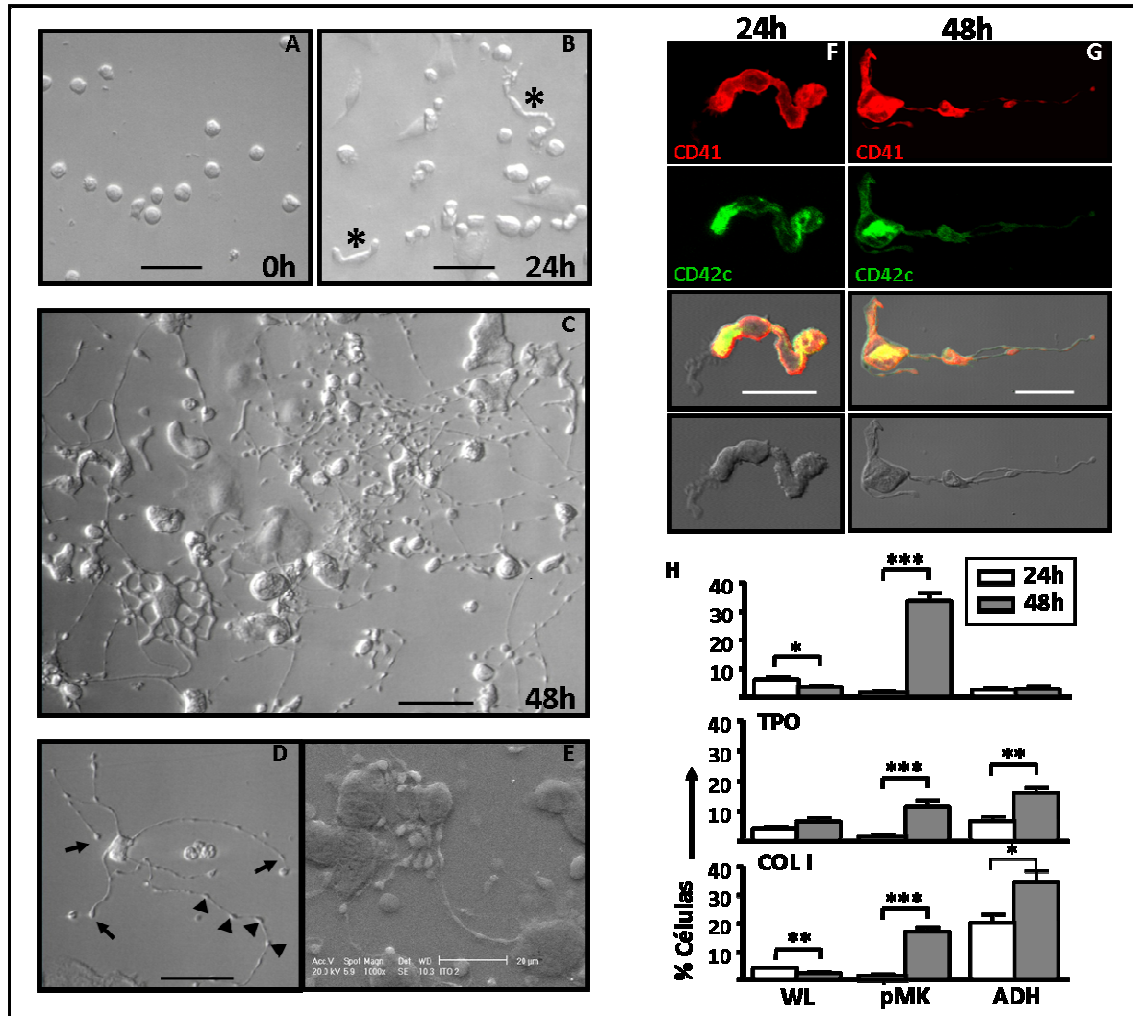


Figura R-14.- Cinéticas del desarrollo *in vitro* de proPTs en cultivos a corto plazo de células purificadas pMKs CD49f^H. Microfotografías de campo claro al inicio de los cultivos (0 horas, A), a 24 horas (B), y 48 horas (C y D) y microfotografía de microscopio electrónico de barrido, a 48 horas (E). Los cultivos fueron llevados a cabo sobre placas tapizadas con colágeno I, en ausencia de TPO. Los asteriscos destacan células fusiformes tipo gusano (WL); las flechas señalan el extremo final o “tip” de las proPTs y las puntas de flecha muestran los abultamientos intermedios en el filamento proplaquetar. Las barras de escala representan 50 μ m. F) y G) Fotografías de microscopía confocal muestran una célula WL (F) y un pMK diferenciado (G) (de un cultivo de 24 y 48 horas respectivamente), teñidas con Acs anti-CD41 (rojo) y anti-CD42c (verde). Se muestran las imágenes correspondientes del campo claro y a las mezclas de los fluorocromos. Las barras de escala representan 20 μ m. H) Gráficos de barras con la cuantificación de los números relativos de células presentes en los cultivos a 24 horas (blanco) y 48 horas (gris). Células tipo WL, con desarrollo de proPTs (pMK) o adherentes (ADH). Los resultados mostrados proceden de cultivos llevados a cabo sobre placas de plástico sin tapizar, en ausencia o presencia de TPO (gráfico superior y central, respectivamente) y de placas tapizadas con colágeno I en ausencia de TPO (gráfico inferior). Los datos se expresan como porcentajes del total de células encontradas en cada condición de cultivo, contando al menos 500 células; medias \pm SEM de cuatro experimentos diferentes (n=50 campos, objetivo 40x). La significación estadística se calculó usando el test *t* Student, **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001.

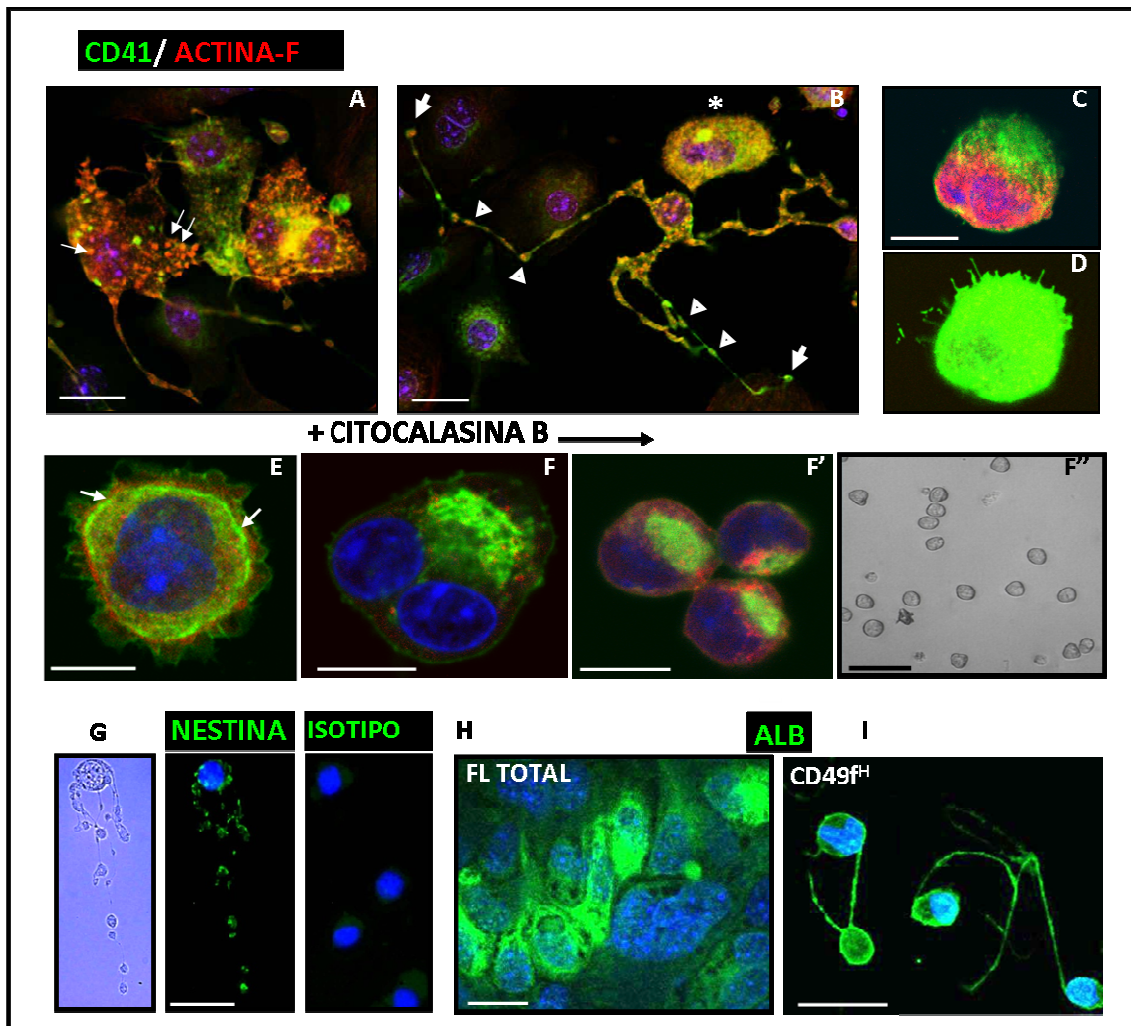


Figura R-15.- Patrón de expresión de CD41, actina-F, ALB y nestina en cultivos de 48 horas de células purificadas CD49^{fH}. Microfotografías representativas de cultivos teñidos con anti-CD41 (verde) y actina-F (rojo; faloidina). Los núcleos se muestran en azul (TOPRO-3) (A y B). Las puntas de flecha señalan los abultamientos intermedios, las flechas señalan el tip y el asterisco destaca una célula adherida con expresión homogénea de CD41 y actina-F. Las microfotografías C) y D) son dos exposiciones diferentes de la misma célula CD41⁺. En el panel inferior, la microfotografía izquierda muestra una vista ampliada de una célula en la que se observa el DMS (flechas blancas). Se muestran los efectos de la adición de citocalasina B a los cultivos en las microfotografías centrales (F y F', CD41 en verde y actina-F en rojo) y derecha del panel medio (campo claro, F''). Las barras de escala representan 10 μm para las imágenes de inmunofluorescencia y 50 μm para la imagen de campo claro. G-I) Las microfotografías muestran la expresión de nestina (G) y ALB (H, I) detectadas mediante inmunofluorescencia en cultivos de 48 horas de células purificadas CD49^{fH} (G, I) o de células de FL11.5 total (H). La señal específica de los Acs se muestra en verde, los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul). Se muestra un control negativo con Acs irrelevantes. Las barras de escala representan 20 μm.

6.- LOS MKs SON UNA POBLACIÓN ABUNDANTE EN EL HÍGADO EMERGENTE.

Las tinciones realizadas con Acs anti-CD41 confirmaron los análisis de CT realizados en paralelo, encontrando un elevado número de células de gran tamaño, CD41⁺, en el hígado de ratón a E11.5 (hasta un 5% del contenido celular hepático por esta técnica; porcentaje 500 veces superior a los observados en BM). Si nos focalizamos en el E11.5, se objetiva una concentración preferente de MKs CD41⁺ en el hígado, sobre todo en áreas periendoteliales que rodean a los grandes vasos (hasta un 60% del total). Casi un 20% de los MKs hepáticos se ubican en una banda celular bien definida situada entre 2-5 diámetros celulares bajo la cápsula de Glisson. Finalmente, los restantes

MKs están dispersos de forma aparentemente estocástica por el resto del parénquima hepático (Figura R-16 A, D, E). Fuera del FL, sólo hemos observado MKs intravasculares en las regiones cefálica, pulmonar, en la AGM y, sobre todo, en las cavidades intracardíacas. En esta última ubicación, es muy llamativa la presencia frecuente de grandes fragmentos subcelulares $CD41^{+}$, de morfología alargada y tendencia a tapizar el endocardio entre las trabéculas ventriculares, así como de PTs fetales (Figura R-16 B, C).

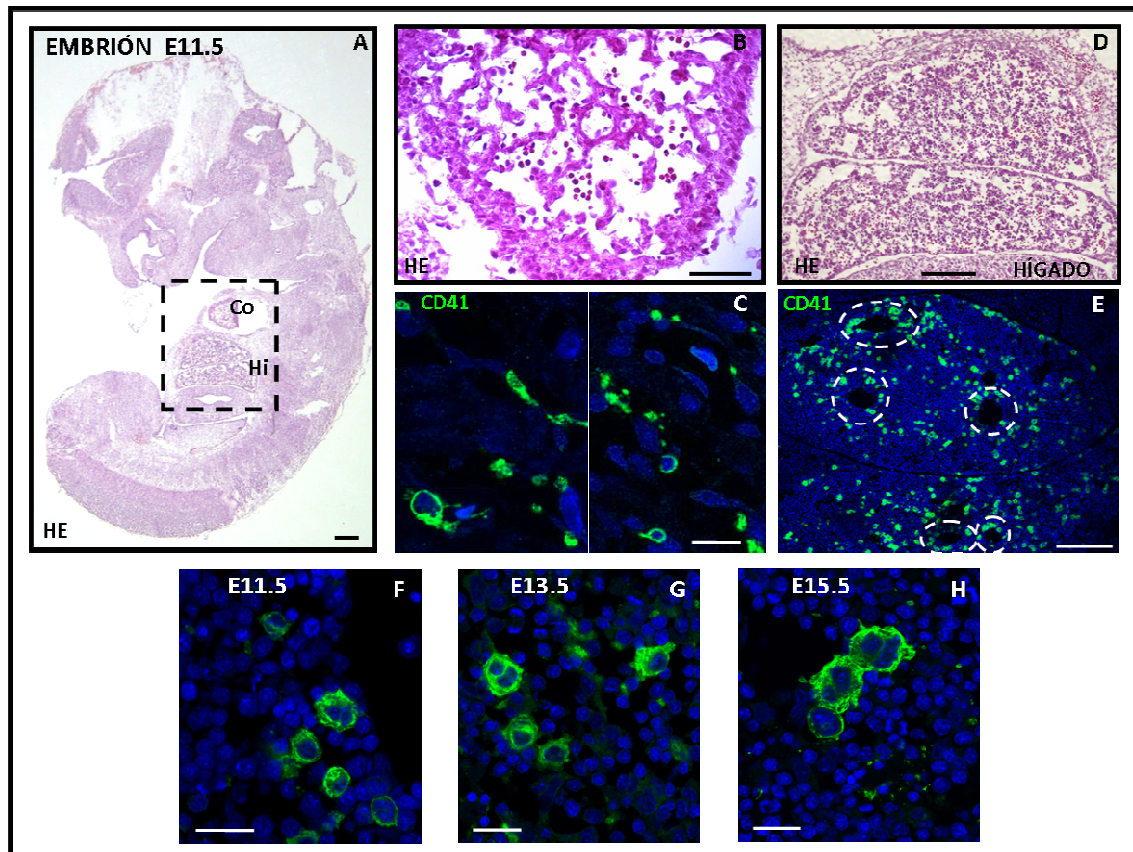


Figura R-16.- Localización *in vivo* de pMKs en el embrión a E11.5. Preparaciones de E11.5-E15.5 fueron cortadas y teñidas con HE (A, B y D) o con anti-CD41-FITC por inmunofluorescencia (C y E). Los núcleos han sido teñidos con TOPRO-3 (azul). **A)** Microfotografía de campo claro de una sección sagital de un embrión a E11.5 teñido con HE; el recuadro destaca el corazón (Co) y el hígado (Hi) que se amplian en B y D. Detección de células $CD41^{+}$ por inmunofluorescencia en corazón (C) y en FL (E) en las que se muestra la distribución de los pMKs alrededor de grandes vasos (círculos), dispersos por el parénquima y en la periferia hepática. **F-H)** Secciones de FL a mayor magnificación muestran el aumento de tamaño de los pMKs desde E11.5 a E15.5. Las barras de escala representan 20 μ m, excepto en A, C, D y E que representa 100 μ m.

Como hemos descrito por CT en el apartado R1, la densidad de MKs disminuye progresivamente a partir de E11.5 aunque, considerando el aumento cuasi-exponencial del tamaño del hígado, esta población sube en número absoluto, pero diluida entre otros tipos celulares que se expanden prioritariamente (p.ej. hepatocitos o eritrocitos). Cabe destacar, por otra parte, un aumento progresivo de su tamaño celular, que pasa de un diámetro de $14,8 \pm 2,6 \mu$ m (media \pm SEM, $n=50$) a E11.5, a $17,3 \pm 2,8 \mu$ m a E13.5, hasta $23,7 \pm 5,2 \mu$ m a E15.5, lo que está probablemente en

relación con el progresivo proceso de poliploidización de los MKs a lo largo de la ontogenia (Figura R-16 F-H).

7.- LOS MKs EMBRIONARIOS HEPÁTICOS EMITEN PROPLAQUETAS *IN VIVO*.

Con el fin de estudiar más en detalle las características subcelulares de los MKs embrionarios, se realizaron tomas a grandes aumentos y reconstrucciones tridimensionales (3D) de MKs presentes en el hígado. Las células son fácilmente identificables por su tamaño, y se presentan individualizadas o en pequeños grupos de 2-3 células, en general, binucleadas. El contorno celular es altamente irregular, presentando pequeñas gemaciones (o “blebs”), así como largos procesos citoplásmicos que son perfectamente trazables en las reconstrucciones 3D, y pueden corresponder a proPTs semejantes a las previamente observadas en cultivos *in vitro* y, recientemente, en la BM de ratones adultos sometidos a tratamiento con TPO (Junt *et al.*, 2007). Su presencia *in vivo* se comprueba también en suspensiones celulares del órgano teñidas con Ac anti-CD41 y depositadas en portas por citocentrifugación (ver Figura R-11). Las prolongaciones presentes *in vivo* en los MKs hepáticos tienen los característicos engrosamientos dispuestos regularmente a lo largo del tallo y una cisterna final de mayor grosor; aunque en ocasiones se emiten hacia el interior vascular, otras veces, las prolongaciones rodean diferentes tipos celulares del parénquima circundante (Figura R-17 D-F).

Inmediatamente tras la purificación de los MKs hepáticos CD41⁺CD42c⁺ por CT apenas se objetivan células con proPTs, que, sin embargo, (re)-aparecen tras 36-48 h de cultivo; dado que los cálculos de las recuperaciones celulares tras disgregación del hígado *versus* los conteos de células CD41⁺ por inmunofluorescencia *in situ* no sugieren una pérdida celular relevante, consideramos que el proceso de emisión de proPTs por los MKs puede ser reversible, al menos durante una fase inicial. Por otra parte, las reconstrucciones 3D (Ver vídeo R-3 y R-4 y la Figura R-15D) objetivaron también la existencia de prolongaciones filiformes del citoplasma de los MKs (1-2 µm de tamaño), compatibles con las denominadas micropartículas (Flaumenhaft *et al.*, 2009), un mecanismo alternativo de fragmentación megacariocítica. Con frecuencia los MKs del FL teñidos con Ac anti-CD41 presentan una imagen característica de “doble membrana”, a veces incompleta, derivada de la presencia preferencial de CD41 rodeando al núcleo y por debajo de la membrana celular (Figura R-17 A, B). Dicho acúmulo que, en algunos análisis en 3D parece definir el polo de avance de células migratorias, en otros rodea la mayor parte de la célula, delimitando un área periférica del citoplasma relativamente libre de orgánulos. Finalmente, el patrón de tinción de actina-F encontrado *in vitro* es reproducido *in vivo*, observándose una acumulación preferencial de actina-F en el cortex celular (en el espacio que existe entre la doble membrana CD41⁺) (Figura R-17 A, B); una serie de pequeños acúmulos en forma de puntos que recuerdan a estructuras tipo podosoma y que se encuentran dispersos por la superficie celular, y finalmente filamentos de actina-F

dibujando el contorno de los “blebs” o evaginaciones de la membrana (Figura R-17 B, C). Por otra parte, se observan fragmentos tipo PT que también presentan expresión de CD41 (delimita la membrana) y actina-F, quedando esta última relegada al interior del cuerpo plaquetar.

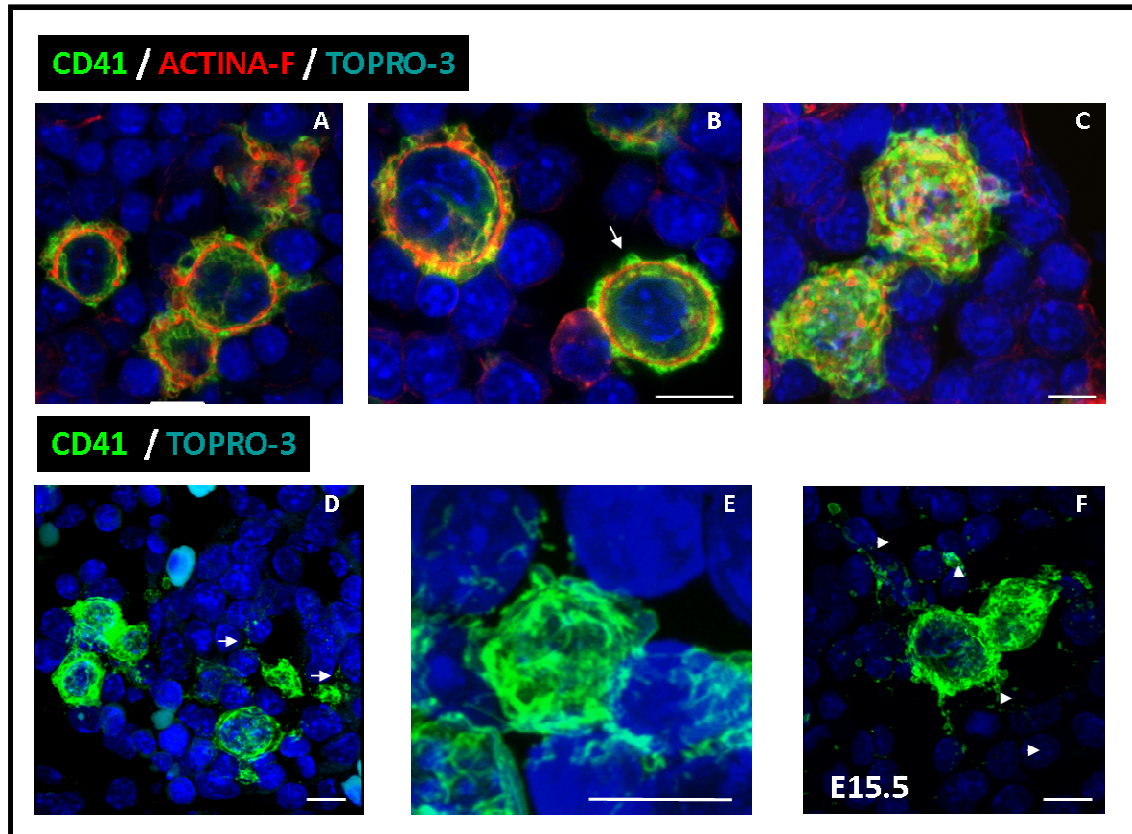


Figura R-17.- Morfología de las células CD41⁺ *in vivo*: Presencia de proPTs. Se muestran microfotografías confocales representativas de tinciones con el Ac anti-CD41 (verde) y faloidina (actina-F; rojo) en secciones tisulares a E11.5 (A-C) y a E15.5 (F) y únicamente con anti-CD41 (D-E), apreciándose la presencia del DMS (A y B), de “bubbles” (flecha en B), de estructuras tipo podosoma (C) y de prolongaciones tipo proPT a E11.5 (D y E) y a E15.5 (F). En azul aparecen los núcleos (TOPRO-3). Las flechas en D y las cabezas de flecha en F señalan prolongaciones tipo proPT. Las barras de escala representan 10 μ m.

8.-NICHOS DE MEGACARIOPOYESIS EN EL HÍGADO DEL EMBRIÓN EN DESARROLLO.

La mayoría de los estudios sobre el desarrollo del sistema hematopoyético intrahepático se centran en la caracterización de los diferentes progenitores *in vitro*, mientras que, a diferencia de lo que ocurre con la BM adulta, poco se conoce acerca de la organización de los nichos celulares *in situ*, así como de las interrelaciones entre el compartimento epitelial hepático y los diferentes linajes hematopoyéticos que se generan simultáneamente durante la vida fetal *in vivo* (Kamiya *et al.*, 1999).

Por ello, nos propusimos en primer lugar analizar la topografía de diferentes linajes celulares (endotelios y células hematopoyéticas) en los primeros estadios del desarrollo hepático (desde E10.5 a E15.5), mediante estudios de inmunofluorescencia combinando Acs específicos de células progenitoras de linaje hematopoyético (CD41, CD45 y F4/80), y de endotelios vasculares (vWF y Tie-2).

8.1.- Los MKs se encuentran asociados al nicho vascular.

Además de representar el componente celular central de la coagulación en condiciones de daño vascular y hemorragia, los MKs tienen un papel relevante en la regulación de la vasculogénesis. Por otra parte, los endotelios vasculares no se limitan sólo a vehicular nutrientes y a oxigenar los tejidos, sino que también son el origen y destino de señales intercelulares críticas en procesos de organogénesis y homeostasis tisular. Este último aspecto ha sido particularmente analizado en el desarrollo hepático por el grupo de K. Zaret (Matsumoto *et al.*, 2001), quien demostró que la ausencia selectiva de vasos (mutantes $Flk1^{-/-}$) bloqueaba la fase de expansión celular del hígado emergente, posterior al establecimiento del programa de diferenciación hepato-específico. Hemos trazado el árbol vascular del FL con Acs anti-Tie-2/TEK y anti- vWF. El primero es un receptor tirosina-quinasa de angiopoyetina, presente en angioblastos y, también, en las primeras HSC del embrión de ratón (hasta E14.5 en el hígado), mientras que el vWF es un polipéptido sintetizado tanto por células endoteliales, donde es almacenado en los cuerpos de Weibel-Palade, como por los MKs, en los que se acumula en los gránulos α . La detección de Tie-2 nos permite identificar tanto a las células endoteliales que forman los grandes vasos como a las que definen la red de sinusoides hepáticos distribuida por el parénquima del órgano. Estas células endoteliales son típicamente aplanadas, con el núcleo protruyendo hacia la luz vascular (Figura R-18 A-C). Además, se observan acúmulos de 4-5 células Tie-2⁺ sin una estructura claramente tubular, quizás debido al plano de corte de las muestras. El doble marcaje Tie-2/CD41 nos permite objetivar que prácticamente todos los MKs CD41⁺ están en contacto directo con células Tie-2⁺, ya sea en el contexto de grandes vasos, como en sinusoides o ramificaciones capilares distales y sólo en contadas ocasiones existe una distancia mayor de 2 diámetros celulares entre el MK CD41⁺ y el endotelio Tie-2⁺, tal vez debida al ángulo de corte, y casi siempre en la vertiente extravascular (Figura R-18 A-C).

El doble marcaje vWF/CD41 confirma los resultados anteriores, revelando con gran nitidez las células endoteliales de la pared de grandes vasos aferentes y eferentes del hígado (vena porta, arteria y vena hepáticas), y en forma más débil las células sinusoidales endoteliales hepáticas, en comparación a la gran expresión presente en vasos extrahepáticos, excepto en el caso del endocardio, donde el vWF presenta también menor nivel de expresión (Figura R-18 E, F, K). Las células CD41⁺ intrahepáticas expresan vWF en un patrón punteado característico, por su presencia en los gránulos α (Figura R-18 G-J, L, M). Existe una co-localización de vWF con el acúmulo de CD41 intracitoplásmico perinuclear, y también, en menor medida, en la región periférica a dicho acúmulo, así como en el interior de las proPTs (Figura R-18 G, L, M).

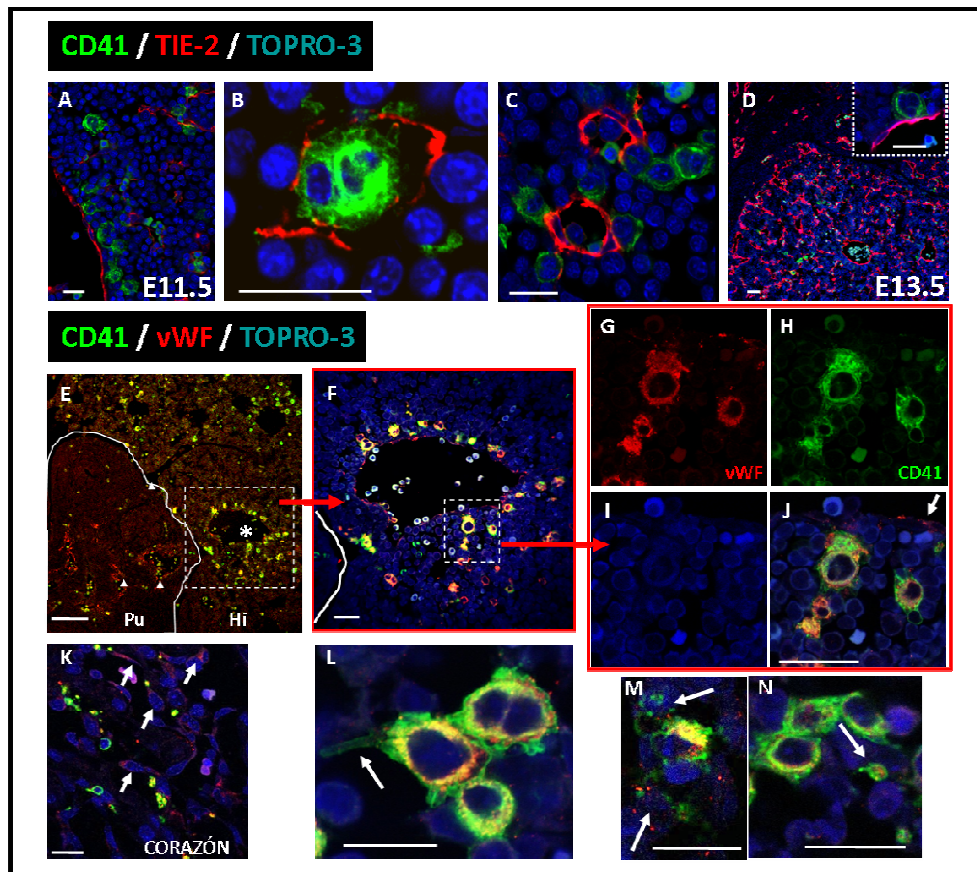


Figura R-18.- pMKs en relación al nicho vascular. A-D) Secciones de embriones a E11.5 fueron teñidas con Acs anti-CD41 (verde), anti-Tie-2 (rojo) y TOPRO-3 (azul). Los pMKs $CD41^{+}$ se encuentran en íntimo contacto con células endoteliales $Tie-2^{+}$ a E11.5 (A-C) y E13.5 (D). En B se muestra la presencia de pMKs intravasculares, emitiendo proPTs. El recuadro en D muestra un detalle de un pMK asociado a un vaso. **E-M)** Secciones de E11.5 teñidas con anti-CD41 (verde), anti-vWF (rojo) y TOPRO-3 (azul, núcleos). La microfotografía panorámica (E) permite apreciar la diferente expresión de vWF en células endoteliales de pulmón (Pu; puntas de flecha en el marco de línea blanca continua) y en hígado (Hi; asterisco, recuadro línea blanca discontinua). Una ampliación de este recuadro se muestra en (F), donde se indica una sección delimitada por el recuadro discontinuo en la que se muestran ampliadas las fluorescencias separadas en cada canal (G-J). En la microfotografía en (K) se muestra un detalle del corazón. Las flechas señalan las células endoteliales. Las microfotografías L-N) muestran detalles de la tinción del Ac anti-vWF a grandes aumentos alrededor del núcleo (L) y co-localizando con CD41 (L-M). Las flechas señalan en L) un pseudopodio, en M) proPTs y en N) una PT. Las barras de escala representan 20 μm , excepto en C y E, que representan 50 μm .

Los análisis realizados en hígado a E13.5, cuando el tamaño y números celulares totales del órgano han experimentado un crecimiento muy importante (entre 65-80 veces más células/hígado que a E11.5), permiten objetivar varias diferencias de interés (Figura R-18 D): (1) el árbol vascular, cuya expresión de Tie-2 ha aumentado, adopta una organización más regular y ordenada, con una disposición radial de grandes vasos centrales, a capilares y sinusoides en la periferia; (2) los MKs $CD41^{+}$ se mantienen sistemáticamente asociados a células endoteliales $Tie-2^{+}$.

8.2.- Las células hematopoyéticas $CD45^{+}$ no se asocian con MKs.

La molécula CD45 está presente en todas las células hematopoyéticas, excepto en las de la serie roja y PTs. Como se ha mostrado antes, a diferencia de los equivalentes adultos, nosotros hemos objetivado que los MKs embrionarios no expresan CD45. Por otra parte y salvo una minoritaria población de linfocitos B y células NK, la mayoría de células $CD45^{+}$ a E11.5 del hígado

embrionario son de estirpe mieloide (monocitos y macrófagos, en diferentes estadios de diferenciación). El estudio *in situ* de las células CD45⁺ reveló una franja celular discontinua enriquecida en dicho tipo celular, con morfología alargada “fibroblastoide”, y situada inmediatamente debajo del mesotelio de la cápsula de Glisson (Figura R-19, A, B). Estas células alargadas se detectan claramente en estudios con tinciones convencionales de HE, como embebidas en la propia cápsula, y representan hasta un tercio del total de células CD45⁺ del hígado a E11.5. El resto de células CD45⁺ están distribuidas de manera irregular a lo largo del parénquima hepático, aisladas o en pequeños grupos de 2-4 células (Figura R-19 A, C) y con dos morfologías diametralmente opuestas: unas células pequeñas y redondas, y otras grandes y amorfas (10,3±1,5 µm de diámetro vs 14,2±2,4 µm), que pueden corresponder a células mieloides más maduras.

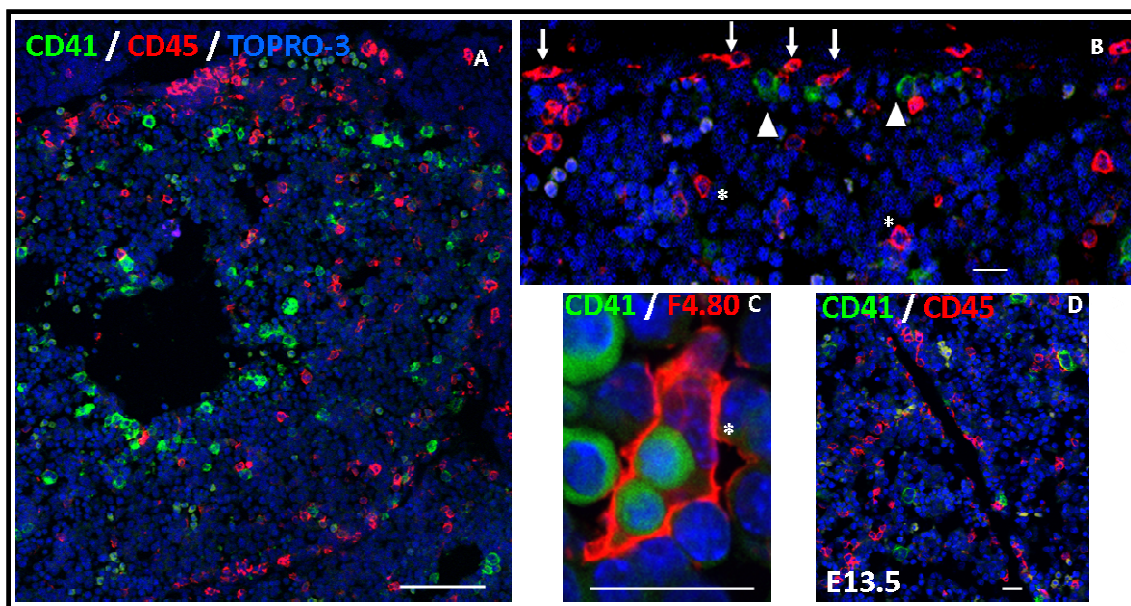


Figura R-19.- Localización de células CD45⁺ y F4/80⁺ en el hígado a E11.5. A y B) Microfotografía panorámica que muestra la expresión excluyente de CD41 (verde) y CD45 (rojo) *in vivo* en el FL11.5. Las células CD45⁺ se encuentran formando una banda periférica discontinua, con una morfología fibroblastoide (B, flechas), y dispersas por el parénquima hepático (asteriscos). C) Detalle de una tinción con anti-F4/80 (rojo) y anti-CD41 (verde). Nótese que en el interior de la célula F4/80 es posible visualizar restos de células eritroides, que se caracterizan por presentar autofluorescencia homogénea en verde. Las células CD41⁺ periféricas se encuentran por debajo de la banda definida por células CD45⁺ (B, punta de flecha). La organización en una banda marginal se mantiene a E13.5, observando co-expresión de CD45 y CD41 en algunas células (D). Los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul). Las barras de escala representan 20 µm, excepto en A), que representa 100 µm.

Sólo una de cada cinco células CD41⁺ contacta con células CD45⁺, lo que no sugiere una asociación preferencial entre ambos tipos celulares. Los dobles marcajes CD45/F4.80 revelaron un patrón de expresión común en los mismos tipos celulares, lo que demuestra que a E11.5, en su mayor parte, corresponden a monocitos/macrófagos altamente diferenciados. De hecho, observamos frecuentemente la presencia de células CD45⁺F4/80⁺ que incluyen material celular fagocitado (Figura R-19 C), en particular, núcleos de pequeño tamaño y fragmentos autofluorescentes, que corresponden a células eritroides, además de otros restos quizás derivados

de cuerpos apoptóticos. En consonancia con estos resultados y como se describe más tarde, mediante tinción HE de secciones hepáticas fetales, podemos observar la presencia de macrófagos fagocitando células eritroides y restos celulares, rodeados de diferentes estadios de células rojas. En el hígado a E13.5, persisten las células CD45⁺ de la franja periférica, mientras que las dispersas por el órgano se sitúan más proximales a los sinusoides hepáticos (mejor definidos en esta etapa gestacional) (Figura R-19 D).

8.3.- Zonas preferenciales de maduración eritroide en el hígado.

Las células eritroides son el componente hematopoyético más importante en el embrión y, particularmente, en el hígado (30-60% a E11.5), por lo que su ubicuidad hace difícil definir áreas topográficas preferentes en su localización. Hemos procedido a su trazado con el marcador Ter119, que define una molécula de membrana asociada a la glicoforina A, y que está presente desde proeritroblastos a eritrocitos maduros, tanto del compartimento primitivo como definitivo de la eritropoyesis. Aunque no de forma absoluta, se pueden realizar cuantificaciones de células Ter119⁺/campo lo que permite establecer varias “zonas eritroides” en el hígado embrionario: (1) En torno a los grandes vasos y sinusoides hepáticos y, en general, por fuera de los MKs perivascuales, se definen anillos de varios diámetros celulares de células Ter119⁺; (2) Cordones radiales de células rojas (4-10 diámetros celulares de grosor) se extienden desde los vasos centrales hacia la periferia del hígado, delimitando áreas libres en dicho tipo celular (Figura R-20 A, C); (3) Existe también una concentración ordenada de células Ter119⁺ en la franja submesotelial del hígado embrionario, que se sitúa específicamente entre la banda de células polarizadas CD45⁺ y los MKs CD41⁺ más distales (Figura R-20 B); (4) Finalmente, las células eritroides dentro del torrente vascular, con altos niveles de Ter119⁺, pequeño tamaño y morfología ovalada, corresponden a estadios más avanzados de diferenciación, aunque en su mayor parte, todavía son Ery nucleados. Aislada, pero regularmente, se observan eritrocitos con núcleo excéntrico, en general, más cerca de los vasos centrales y en el torrente vascular (Figura R-20 L, M).

En tinciones de HE, se detectan frecuentemente agregados celulares compuestos por un macrófago (con núcleos fagocitados en su interior) y una corona de células eritroides en diferentes estadios de maduración, entre los cuales se encuentran elementos enucleados. Esta imagen es característica de los islotes eritroblásticos, cuya presencia no ha sido descrita antes de día 14.5 de la gestación de ratón (Gordon *et al.*, 1986; Sasaki *et al.*, 1993) (Figura R-20 D-F). Llama la atención que muchos de estos “islotes eritroblásticos” se encuentran dentro de los vasos intrahepáticos, mientras que los eritrocitos recirculantes en otras localizaciones del embrión tienden a presentar características celulares de mayor madurez (menor tamaño, relación núcleo/citoplasma disminuida y mayor afinidad por el colorante eosina, es decir son más acidófilos, apareciendo con una intensa coloración rosácea), nucleados o no, lo que sugiere algún tipo de restricción a la recirculación sanguínea entre la periferia vascular y el hígado (Figura R-20 K).

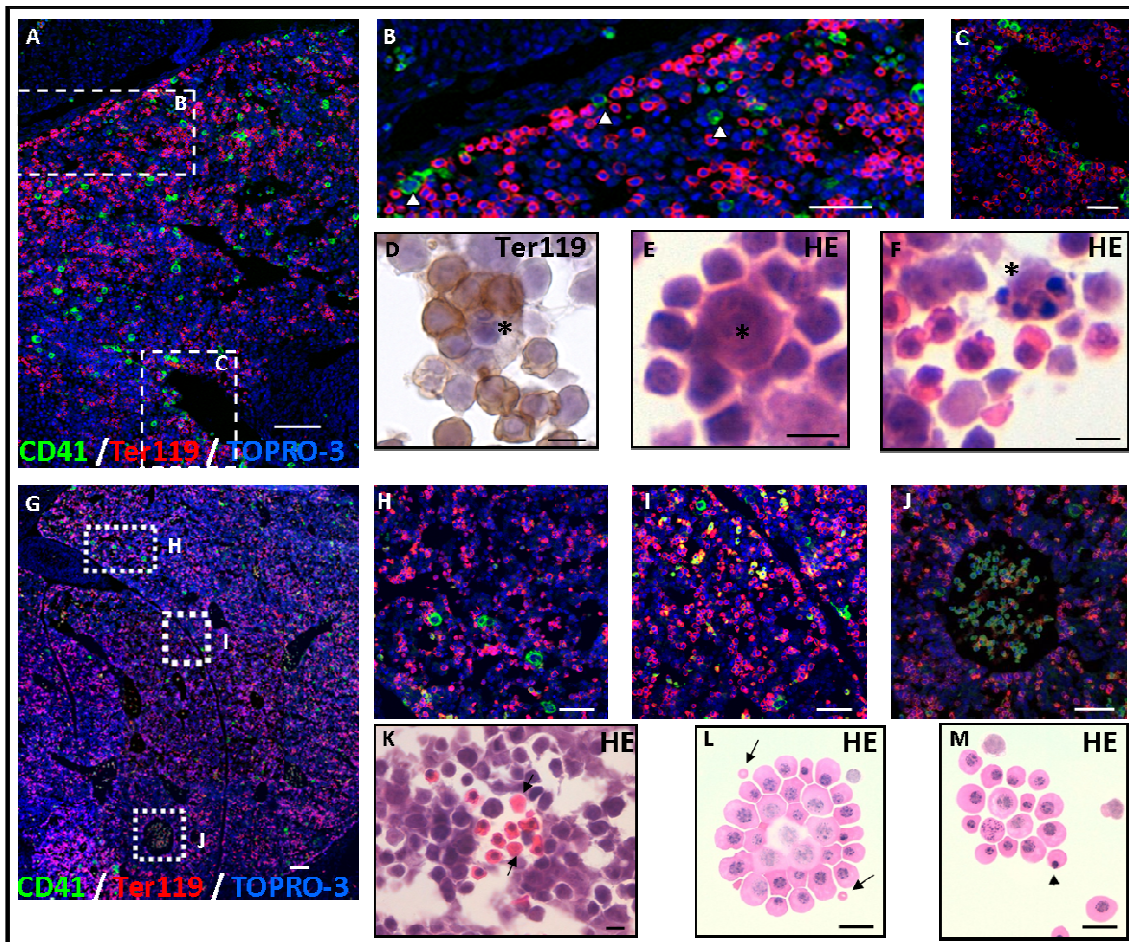


Figura R-20.- El FL es el principal órgano de maduración eritroide. **A)** Microfotografía panorámica que muestra la expresión de CD41 (verde), Ter119 (rojo) y TOPRO-3 (azul, núcleos) en una sección tisular de E11.5 **B)** Área periférica hepática, en la que se muestra que los Ery forman una banda por debajo de la cápsula de Glisson. Los pMK se encuentran intercalados en, o por debajo de esta banda (punta de flecha). **C)** Microfotografía de un vaso hepático, rodeado por Ery y pMK. **D-F)** Tinciones con Ac anti-Ter119 o con HE, muestran la existencia de grupos de células Ery alrededor de células con apariencia de macrófagos (asteriscos). La microfotografía panorámica en **G)** a E13.5 muestra un gran aumento en el componente eritroide. Los recuadros blancos muestran las zonas ampliadas en **H-J)** y detalles de diferentes áreas. **K)** Tinción HE de una sección hepática que muestra células Ery teñidas con eosina (rosa) en el interior de un vaso. alguna de estas células ha perdido ya el núcleo (flechas). **L-M)** Células de la circulación periférica (**L)** o del árbol vascular hepático (**M)** fueron depositadas en portaobjetos y teñidas con HE. Nótese la baja presencia de células anucleadas (flechas) y la existencia de células con el núcleo polarizado hacia un lado de la célula (punta de flecha). Las barras de escala en **A)** y **G)** representan 100 μm , en **B), C), H), I)** y **J)** representan 50 μm y en el resto 10 μm .

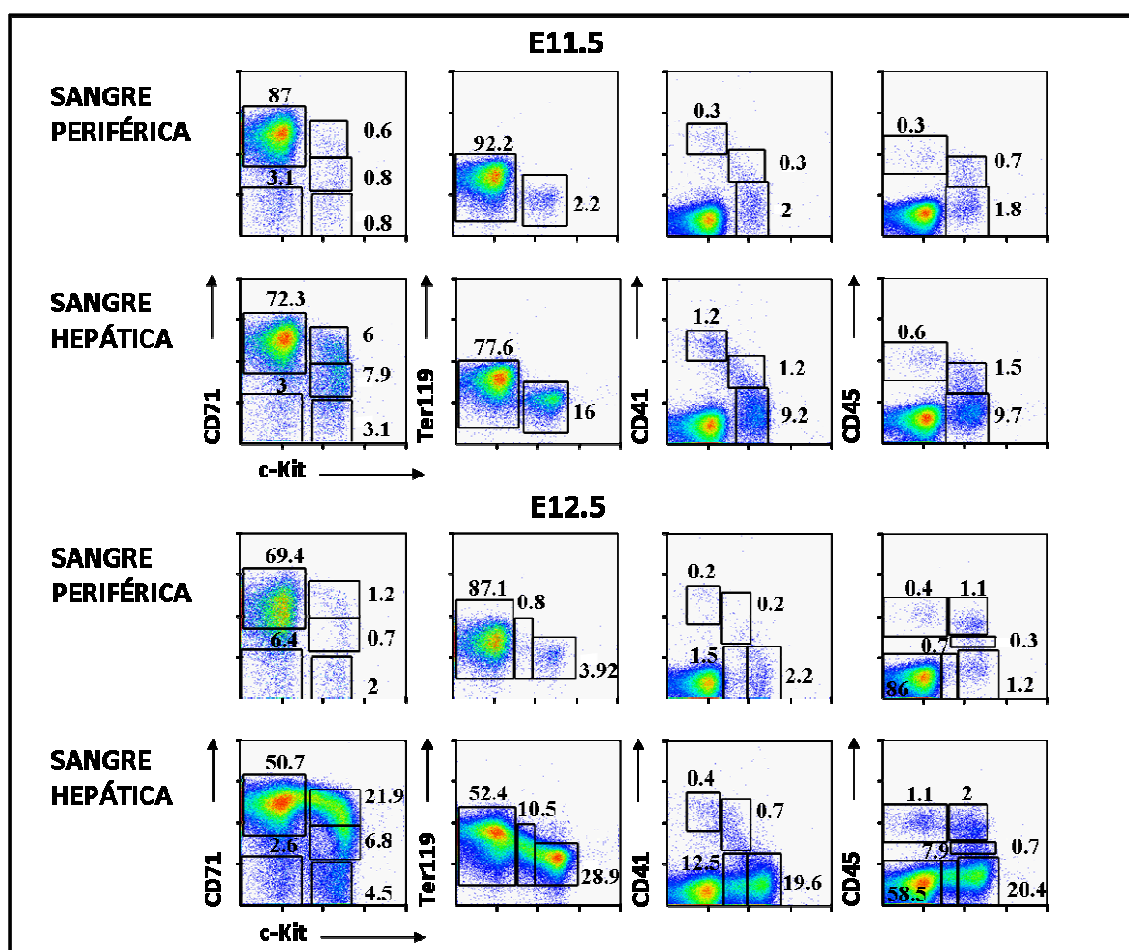


Figura R-21.- Fenotipo de las células aisladas de PBL y de la circulación intrahepática por CT a E11.5 y E12.5. Los dot plots muestran tinciones dobles con los Acs indicados. Los rectángulos definen diferentes poblaciones y los números sobre ellas representan los porcentajes de células de cada población.

Para clarificar este punto, realizamos un experimento consistente en la extracción quirúrgica del hígado, seguida del exanguinado tanto de los órganos extraídos como del resto de los embriones de E11.5 y E12.5, de tal forma que recogemos por un lado las células que se encuentran circulando por todo el cuerpo, y por el otro las células que se encuentran en el árbol vascular hepático (Figura R-20 L, M y Figura R-21). El marcaje triple mediante CT con los marcadores c-Kit, Ter119 y CD71 (receptor de transferrina presente, entre otros, en progenitores eritroides y reticulocitos, pero no en eritrocitos maduros), permite trazar los diferentes estadios de diferenciación eritroide, que comienza con células $c\text{-kit}^{++}$ que a continuación co-expresan CD71 ($c\text{-kit}^{+}CD71^{+}$) y más tarde Ter119 ($CD71^{++}Ter119^{+}$), para finalmente, perder la expresión de c-kit y CD71 y mantener la de Ter119 (Figura R-21). El resultado muestra que en sangre periférica de embriones a los que previamente habíamos extirpado el hígado, hay una disminución drástica del número de progenitores más inmaduros $c\text{-kit}^{++}$ y $c\text{-kit}^{++}CD71^{+}$, lo que concuerda con la hipótesis de la existencia de una cierta barrera que impide salir a los eritrocitos más inmaduros hacia la circulación, y que afectaría también a células progenitoras $c\text{-Kit}^{+}$ y a MKs $CD41^{+}$. La organización del

linaje eritroide a E13.5 básicamente extiende y define mejor la topografía eritroide encontrada a E11.5 (Figura R-20 G-J): las coronas Ter119⁺ externas rodeando a los MKs perivascuales, los cordones radiales que se extienden desde vasos centrales hacia la periferia del órgano y también la formación de una banda periférica submesotelial. Cabe destacar que los espacios carentes del componente eritroide predominante aumentan su tamaño relativo dentro del órgano, probablemente representando una expansión del componente hepato-epitelial del hígado. Aumenta también el grado de diferenciación de las células eritroides, así como el número de Ery anucleados.

9.- RELACIÓN ENTRE pMKs Y PROGENITORES HEPATO-EPITELIALES (pHep).

En nuestro estudio previo (Minguet *et al.*, 2003) mostrábamos que la población c-Kit^DCD45⁻CD49f^{H/D} crecía *in vitro* y en organoides generando hepatocitos y colangiocitos. Además, el relativamente elevado número de pMKs y la íntima relación fenotípica de las poblaciones de pMK y pHep presentes en el FL temprano, nos ha hecho estudiar sus influencias mutuas en cultivos *in vitro*.

9.1- Los pMKs de FL11.5 son necesarios para el desarrollo *in vitro* de capas hepato-epiteliales.

Como hemos descrito previamente (apartado 5), la población purificada de pMK CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ origina MKs en cultivo tras 48 horas, y a partir de los 5-7 días las proPTs desarrolladas se encuentran entremezcladas unas con otras, impidiendo su clara individualización (no mostrado). Por el contrario, las células progenitoras purificadas CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ crecen mal en cultivo sobre cualquier superficie testada (cubiertas con colágeno I, laminina, fibronectina o sin tapizar), y a día 3 de cultivo la mayoría de las células han muerto. Sin embargo, al mezclar ambas poblaciones purificadas en una proporción de 1/3 (CD49f^D/CD49f^H; próxima a la encontrada en la población sin purificar), observamos de nuevo el crecimiento de cultivos en monocapa con las mismas cinéticas y forma descritas para los cultivos de las células sin purificar c-Kit^DCD45⁻ Ter119⁻ (Figura R-22 B).

El co-cultivo de ambas subpoblaciones sobre cámaras de cultivo celular cubiertas con colágeno I/III (cámara superior del *transwell*) y con un poro de 0,4 µm, arroja resultados similares a los obtenidos cuando ambos tipos de subpoblaciones celulares crecen juntas en soportes cubiertos con colágeno (Figura R-22 C). Por el contrario, observamos un menor nivel de crecimiento de la capa hepato-epitelial formada por las células CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ cuando la subpoblación de pMK CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ crece en la cámara inferior, a pesar del desarrollo de MK con proPTs de estos cultivos *in vitro*. La maduración de las células se cuantificó de forma más precisa mediante la determinación de la expresión de ALB en las células que crecen en estos co-cultivos sobre las cámaras superiores, y refiriéndolo al valor de las células CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ cultivadas solas. Los pMKs cultivados solos durante siete días pierden la expresión de ALB. El aumento en la expresión de ésta en los co-cultivos es de cuatro veces cuando las células CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ pMK y pHep

CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ crecen juntos en la misma cámara ($p < 0,05$), y de dos veces cuando se encuentran separadas por la membrana (Figura R-22 D).

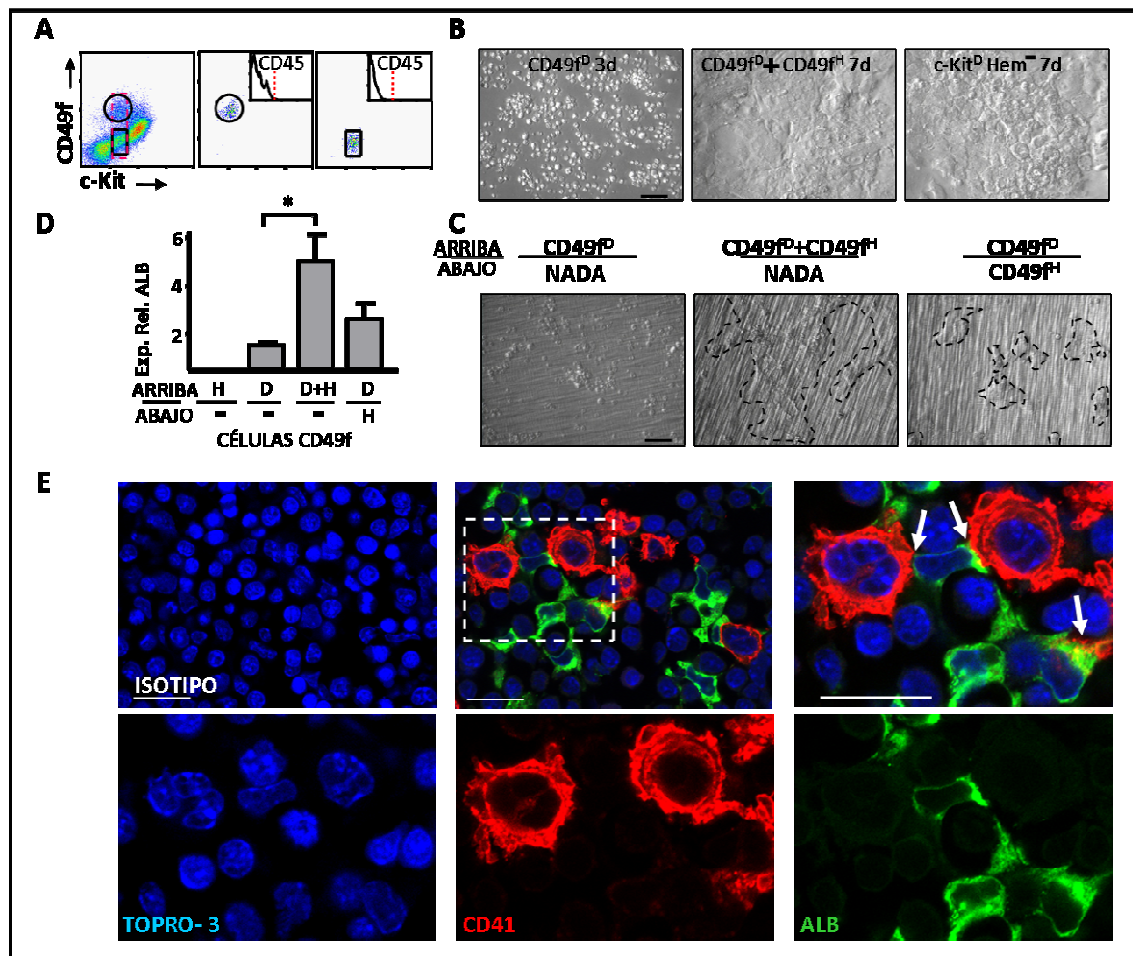


Figura R-22.- Interacciones entre pMKs y pHep en FL11.5. **A)** Células c-Kit^DHem⁻ (rectángulo rojo en línea discontinua), CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ (pMK; círculo negro) y CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻ (pHep; rectángulo negro) fueron purificadas a partir de suspensiones celulares de FL a E11.5 mediante FACS. Los dot plot de la derecha muestran la purificación y los histogramas dentro de éstos la expresión de CD45 en las poblaciones purificadas. **B)** Las células purificadas fueron puestas en cultivo. Las microfotografías muestran imágenes de campo claro de los cultivos a 3 y 7 días de células purificadas CD49f^D (izquierda) y co-cultivadas con células CD49f^H (centro), y de cultivos de la población c-Kit^DHem⁻ (derecha). **C)** Cultivos realizados en cámaras transwell. Las microfotografías corresponden a imágenes de la cámara superior de los cultivos transwell (7 días) realizados como indica las combinaciones de células en cada cámara. Las líneas discontinuas resaltan las capas epiteliales desarrolladas. Barras de escala, 50 μ m. **D)** La expresión de ALB en células crecidas en los insertos de los cultivos transwell (7 días) analizada mediante PCR-TR como en la Figura R-13C. **E)** Tinción con Acs anti-CD41 (rojo) y anti-ALB (verde) de una sección tisular de FL11.5. Los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul). La microfotografía de la izquierda muestra la imagen obtenida con Acs irrelevantes. El cuadrado dibujado en la microfotografía central aparece ampliado en la imagen de la izquierda e imágenes inferiores, que muestran los canales de fluorescencia mezclados e individuales de cada tinción. Los contactos entre células CD41⁺ (rojo) y ALB⁺ (verde) aparecen en amarillo, y son destacadas mediante flechas blancas. Barra de escala, 20 μ m.

Estos datos indican que aunque se requiere el contacto celular para alcanzar el pleno desarrollo de los cultivos hepato-epiteliales, los factores solubles también tienen un efecto parcial en este proceso. En este sentido, la adición de sobrenadantes obtenidos de cultivos de pMKs al

inicio de los cultivos de células CD49^f^Dc-Kit^DCD45⁻, también permitió una recuperación parcial de las monocapas hepato-epiteliales (no mostrado) elevando 2,42 veces la expresión de ALB con respecto a la población cultivada con el medio sin sobrenadante. Se ha propuesto que diversos factores solubles pueden influir en el crecimiento del hígado y en la regeneración tras daño hepático (Lesurtel *et al.*, 2006; Sugiyama *et al.*, ; Taniguchi *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2010). Entre otros, se encuentran la serotonina almacenada en los gránulos densos de los MK y PTs, el VEGF-A, el HGF y el EGF. Nuestro medio de cultivo contiene HGF y EGF, por lo que descartamos su papel en el establecimiento diferencial de monocapas epiteliales que observamos en este proceso. Analizamos el efecto de la serotonina y el VEGF-A añadiéndolos a dosis óptimas al inicio de los cultivos de pHep CD49^f^Dc-Kit^DCD45⁻, no detectándose efectos significativos de la serotonina en estos cultivos. Sin embargo, en el caso VEGF-A observamos una promoción del desarrollo de placas hepato-epiteliales y un aumento en la síntesis de ALB (1,86 veces más expresión).

9.2- Relación entre células del componente hepato-epitelial y los pMKs *in vivo*.

Decidimos utilizar la detección de la presencia de ALB por inmunofluorescencia como trazador del componente epitelial del hígado emergente, porque en el hígado adulto sólo los hepatocitos producen ALB. Aunque como se ha mostrado en el apartado R-4 en el FL, y también en el YS (Asahina *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 1980), existen poblaciones celulares que expresan bajos niveles de ALB y otros genes hepáticos en condiciones fisiológicas, pensamos que el elevado nivel de expresión de esta proteína permitiría identificar pHep diferencialmente. El primordio hepático se objetiva a E10.5 como un agregado relativamente compacto de células ALB⁺, de morfología irregular y polarizada, con una tendencia a la formación de hileras que rodearán a futuros sinusoides hepáticos (Figura R-23 A-C). El componente hematopoyético es minoritario en este estadio (< del 3,1 ± 0.5% según nuestros datos de CT, ver figura R-5, regiones R1 y R2 a E10.5). A E11.5, el hígado ha experimentado un intenso proceso de crecimiento (70 veces más células totales que a E10.5) y los precursores hepáticos ALB⁺ representan el 18,5±3,7 % del total celular del órgano (Figura R-23 D-G, Tabla R-3). Estas células ALB⁺ presentan contorno poligonal y tamaño heterogéneo, y forman hileras o isletas de aproximadamente 3-8 células. Aunque se pueden encontrar dispersas por el parénquima del órgano, se ubican preferentemente en aquellas zonas radiales que parten de los grandes vasos, y que están carentes del componente eritroide (Figura R-24 A, C). En el espacio perivascular y en la corona hematopoyética submesotelial no se observan células ALB⁺ (Figura R-24 B, F). Casi la mitad de los pMKs CD41⁺ presentan contactos celulares con hepatoblastos ALB⁺ por medio de los procesos citoplásmicos de los primeros, sobre todo en zonas próximas a los vasos (Figura R-22E y Tabla R-3). A E15.5, la frecuencia de células ALB⁺ aumenta 1,6 veces con respecto a E11.5 (29,7±9,3%; 6x10⁶ células ALB⁺/hígado), presentan formas poligonales menos irregulares, y su disposición en hileras desde la periferia del órgano hasta los vasos centrales

es más nítida y organizada, incrementando también el número de células por hilera (>8 células/hilera) (Figura R-23 G, R-24 F). A E13.5 se aprecia más claramente la concentración de células ALB⁺ en la proximidad de los vasos centrales donde también se concentran los MKs (que son ahora más infrecuentes) (Figura R-24 D).

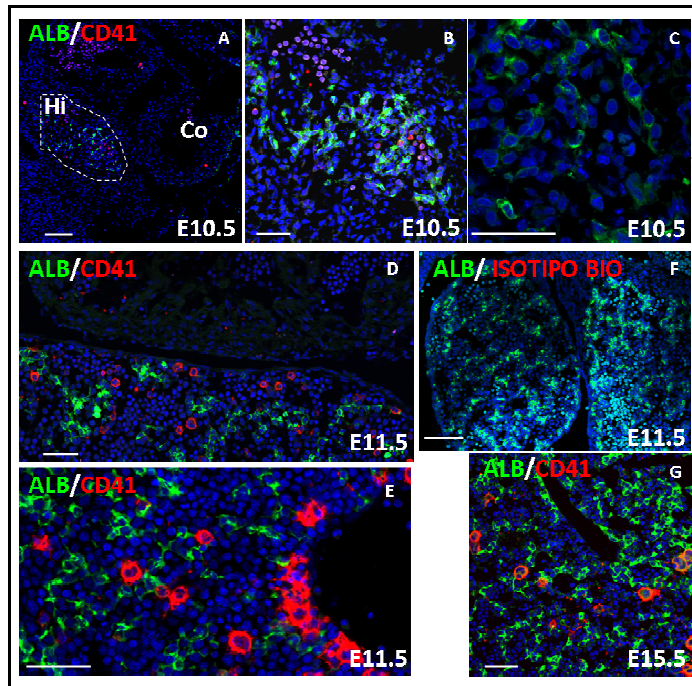


Figura R-23.- Localización *in vivo* de células ALB⁺ y MKs. A-C) Secciones tisulares de E10.5 teñidas con anti-ALB (verde) y anti-CD41 (rojo). Los núcleos han sido teñidos con TOPRO-3. A) Microfotografía panorámica de un embrión a E10.5, en la que se destaca el primordio hepático (Hi) y el corazón (Co). B) y C) muestran a mayor aumento la región marcada con línea discontinua en A). D) y E) Secciones de E11.5 correspondientes al área periférica y del centro del hígado, respectivamente. F) Microfotografía panorámica del FL a E11.5 teñido con Ac anti-ALB (verde) y control de isotipo (rojo). G) Microfotografía de una sección tisular hepática a E15.5. Las barras de escala representan 50 μ m, excepto en A) y F) que representan 100 μ m.

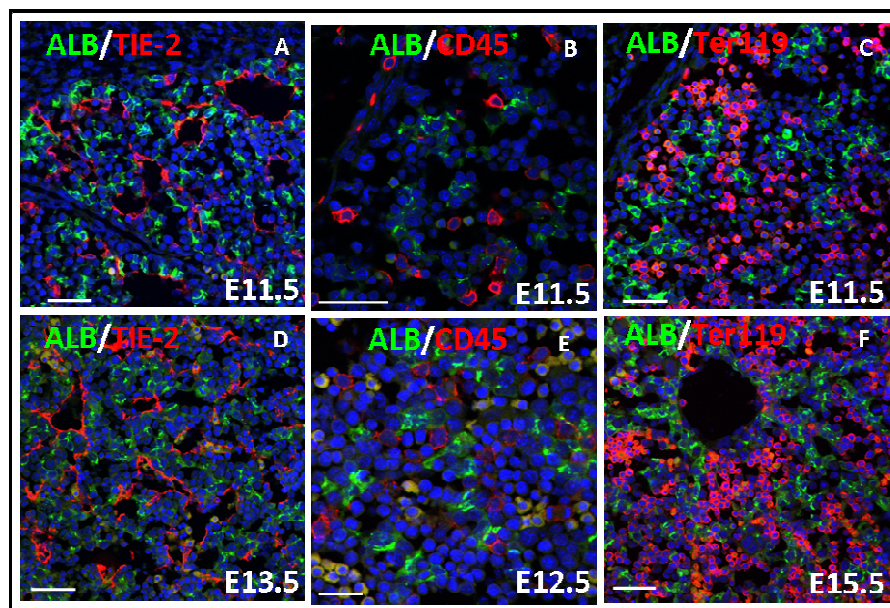


Figura R-24.- Expresión de ALB *in vivo* E11.5-E15.5. Se muestra la expresión de ALB combinada con Tie-2 (A, D), CD45 (B, E) y Ter119 (C, F) en secciones de FL11.5 (A, B, C), FL12.5 (E), FL13.5 (D) y FL15.5 (F). Los experimentos se realizaron como se indica en la Figura R-15. Las barras de escala son 50 μ m.

10.- PROGENITORES INMADUROS Y PROLIFERACIÓN HEPÁTICA DURANTE LA MORFOGÉNESIS

10.1.- Concentración preferencial de células progenitoras en la periferia hepática.

Los progenitores hematopoyéticos y hepato-epiteliales más inmaduros pueden ser definidos por la expresión del receptor c-Kit. A día 11.5 de la gestación constatamos, de acuerdo con nuestros datos por CT, que existe un elevado número de células c-Kit⁺ (41,6%), que disminuye según avanza, tanto la diferenciación de la célula hacia un linaje determinado, como la gestación (el porcentaje de células c-Kit⁺ disminuye a E12.5 1,56 veces, ver Tabla R-3). A E11.5 las células c-Kit⁺ son redondas, con una relación núcleo/citoplasma elevada y un tamaño relativo grande, aunque intermedio entre las células eritroides y los MKs (ver Tabla R-3). A día 12.5 su aspecto pasa de redondeado a poligonal, sin variar su diámetro celular. Tanto a E11.5 como a E12.5 la mayoría (75-80%) de las células c-Kit⁺ se encuentran agrupadas, siendo frecuente observar acúmulos de 2 a 8 células. Al contrario de lo que ocurre con células hematopoyéticas más maduras, no encontramos células c-Kit⁺ en una localización o nicho preferencial, sino que se encuentran aparentemente distribuidas por el parénquima hepático en los espacios libres de células eritroides. Sin embargo, parecen estar excluidas de la banda subcapsular definida por las células CD45⁺ y Ter119⁺. Para facilitar un análisis morfométrico más detallado, dividimos el FL en dos zonas: una central y una periférica, definiendo ésta última de forma arbitraria como la región comprendida 25 diámetros celulares por debajo de la cápsula de Glisson (Figura R-25 A y Tabla R-3). A E11.5, las células c-Kit⁺ se concentran preferentemente en la zona central del órgano (ver Tabla R-3, 46,5% de las células localizadas en la zona centro son c-Kit⁺, frente al 36,7% en el caso de la zona periférica, $p < 0,01$). El elevado número de células c-Kit⁺ dificulta la cuantificación precisa diferencial de los contactos con células CD41^H aún así, casi el 70% de los MKs contactan con células c-Kit⁺, sobre todo en la zona periférica (77,9% *versus* 62,6%). Es de destacar que la localización de las células c-Kit⁺ a E12.5 se invierte respecto a E11.5, encontrando ahora el 25,1% de las células en la periferia y el 16,9% en el centro ($p < 0,05$), lo que sugiere que las células c-Kit⁺ que colonizan el hígado a través de los vasos son empujadas hacia la periferia por las células más maduras que diferencian en la zona central. El número de células c-Kit⁺ que se encuentran adyacentes con células CD41⁺ disminuye de día 11.5 a 12.5 (ver Tabla R-3), aunque seguimos encontrando un mayor número de contactos en la periferia.

Para diferenciar entre aquellas células c-Kit⁺ que corresponden a progenitores hematopoyéticos de los hepato-epiteliales, realizamos dobles marcajes con Acs anti-ALB y anti-c-Kit a E11.5, E12.5 y E15.5 (Figura R-25 B). En estos estudios observamos que a E11.5 y a E12.5: 1) El $66,7 \pm 10,3\%$ de las células c-Kit⁺ se encuentran en contacto con hileras de células ALB⁺ o en el interior de isletas ALB⁺; 2) Existen pocos hepatoblastos doble positivos ($2,7 \pm 0,5\%$), que suelen formar parte de las hileras/isletas ALB⁺. 3) A E15.5, el número de progenitores c-Kit⁺ disminuye drásticamente ($3,3 \pm 2,4\%$), así como su nivel de expresión, aunque se mantiene su localización junto

a células ALB⁺. La presencia de hepatoblastos c-Kit⁺/ALB⁺ es muy baja ($0,23 \pm 0,38\%$) a partir de este día, reflejando el grado de diferenciación hacia colangiocitos/hepatocitos (Ver Tabla R-3).

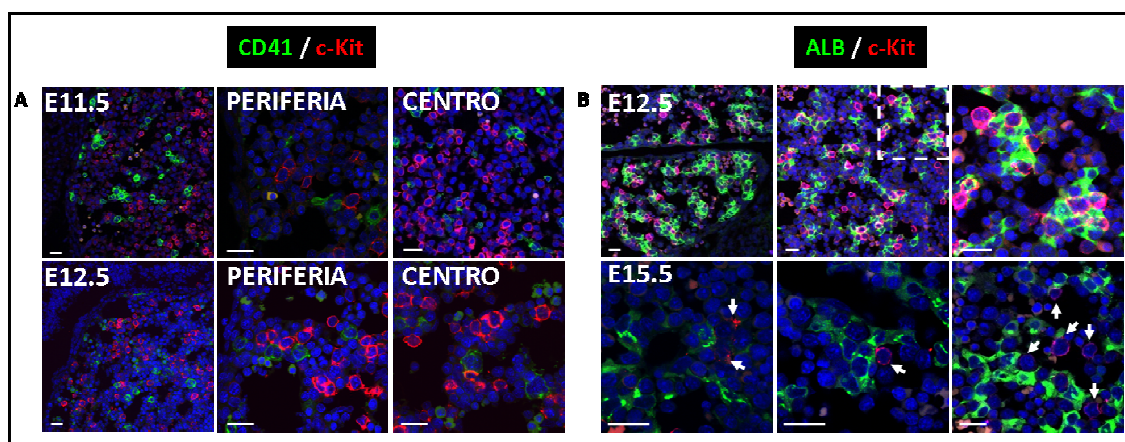


Figura R-25.- Detección de los progenitores c-Kit⁺ en el embrión a E11.5- E15.5. Secciones tisulares hepáticas teñidas con Ac anti-c-Kit (rojo) y anti-CD41 (verde) (A) o anti- ALB (verde) (B) a los días de gestación indicados. Los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul). En el recuadro ampliado de la foto central en B), se observa la presencia de células dobles para c-Kit⁺ y ALB⁺ (hepatoblastos) en el interior de las isletas. En FL15.5 disminuye el número de células que expresa c-Kit y el nivel de expresión del mismo (flechas). Las barras de escala representan 20 μ m.

	CD41 ⁺⁺	CD45 ⁺	Ter119 ⁺	ALB ⁺	c-Kit ⁺ E11.5	c-Kit ⁺ E12.5
Citometría de flujo						
(% de células)	8.0 \pm 0.3	15.9 \pm 0.6	24.4 \pm 0.5*	ND	53,1 \pm 2.0	ND
Inmunofluorescencia						
(% de células)	5.0 \pm 0.9	10.5 \pm 1.4	54.3 \pm 5.3	18.5 \pm 1.4	41.6 \pm 1.8	21.0 \pm 2.0
					36.7 \pm 1.4 (Pe) / 46.5 \pm 1.9 (Ce)	25.1 \pm 2.2 (Pe) / 16.9 \pm 1.7 (Ce)
Diámetro celular						
(μ m)	14.8 \pm 2.6	10.3 \pm 1.5	7.6 \pm 1.1	ND	10.4 \pm 0.8	ND
Células CD41 ⁺						
(% de contactos)	ND	20.3 \pm 3.7	ND**	49,5 \pm 9.6	~70	~25
					77.9 \pm 13.1 (Pe) / 62.6 \pm 8.4 (Ce)	30.0 \pm 0.4 (Pe) / 20.8 \pm 0.3 (Ce)
Células EdU ⁺						
(% del total)	38.8 \pm 2.8	34.7 \pm 3.5	46.4 \pm 4.1	ND	58.3 \pm 3.0	ND
					56.1 \pm 2.1 (Pe) / 60.5 \pm 4.4 (Ce)	

Tabla R-3.- La tabla muestra el porcentaje de células de las diferentes subpoblaciones hepáticas a E11.5 en el FL, obtenido mediante CT e inmunofluorescencia, así como el diámetro celular, el porcentaje de células CD41⁺ que establece contactos con otros tipos de células y la proliferación celular (células EdU⁺). En el caso de las células c-Kit⁺ el FL se ha subdividido en dos zonas: Pe= periferia y Ce=centro. Los valores mostrados corresponden a la media \pm SEM. Los contejes han sido realizados por dos observadores independientes (n=30 campos; objetivo 40x en el caso de contejes por inmunofluorescencia y n=10 muestras de FL11.5 para CT). * La ventana de células que analizamos por CT excluye a las células más pequeñas, por lo que el conteje obtenido por este método es menor. ** El elevado número inicial de células Ter119⁺ impide este cálculo. ND: No determinado.

10.2.- Proliferación diferencial de células hematopoyéticas en el FL a E11.5.

Como ya se ha mostrado, el FL es un órgano que durante el desarrollo embrionario incrementa exponencialmente su número de células en un corto espacio de tiempo (días e incluso horas), presentando una alta tasa de proliferación. Los resultados mostrados en el apartado 10.1, sugieren que los progenitores se van desplazando desde el centro del hígado hacia la periferia, lo que nos ha hecho plantearnos el estudio de proliferación *in vivo* de las diferentes poblaciones hematopoyéticas (Figura R-26). Para ello realizamos un ensayo de proliferación inyectando un análogo de timidina, EdU, en las hembras gestantes (E11.5), y lo detectamos por inmunofluorescencia junto con marcajes con Acs específicos para trazar diferentes poblaciones hematopoyéticas (Figura R-26 y Tabla R-3). Los resultados obtenidos muestran que a E11.5 las células progenitoras c-Kit⁺ presentan las más altas tasas de proliferación ($58,3 \pm 7,6\%$), seguidas de las células eritroides ($46,4 \pm 8,2\%$), las células CD41⁺ ($38,8 \pm 4,0\%$) y las células CD45⁺ ($34,7 \pm 8,2\%$). Las tinciones con Acs que reconocen el Ag Ki67 confirman estos datos (no mostrado). Además, en el caso de las células c-Kit⁺ observamos que existe una proliferación ligeramente mayor en el centro del hígado ($60,5 \pm 4,4\%$ de las células c-Kit⁺ son EdU⁺ en el centro vs $56,1 \pm 9,3\%$ en la periferia, ns), de acuerdo con la ya mencionada mayor concentración de células c-Kit⁺ en este área. Sin embargo, el alto número de células en proliferación impide realizar cuantificaciones más precisas utilizando este protocolo.

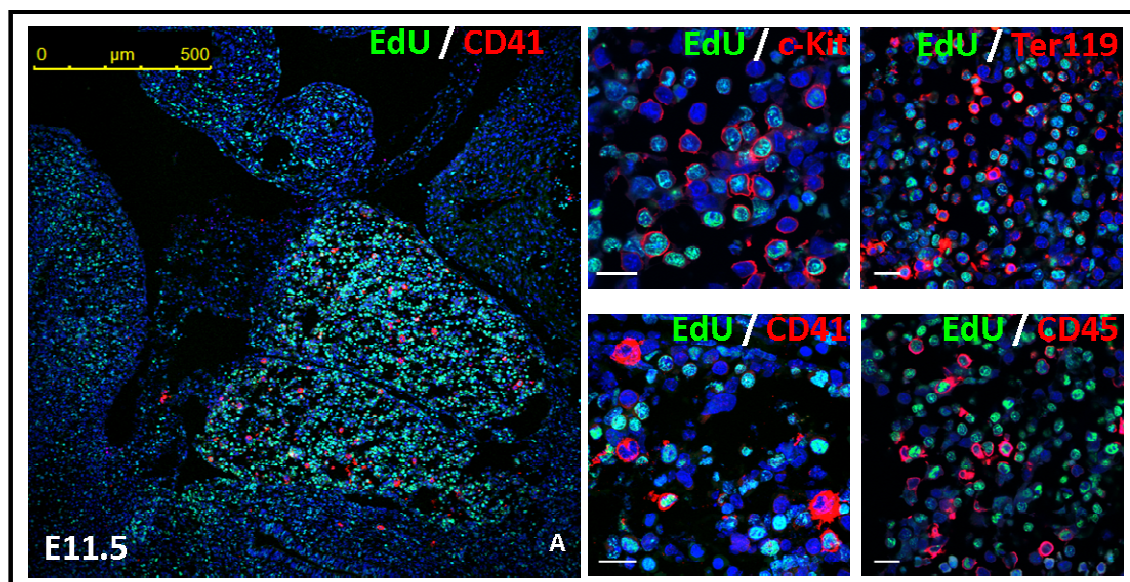


Figura R-26.- Patrón de proliferación *in vivo* de células en el hígado a E11.5. Se muestra el ensayo de proliferación llevado a cabo mediante la inyección de EdU y su posterior detección por inmunofluorescencia (verde), combinado con diferentes Acs (anti-c-Kit, anti-Ter119, anti-CD41 y anti-CD45, rojo). **A)** Microfotografía panorámica (izquierda) que muestra el mayor número de células EdU⁺ en el hígado con respecto a otros órganos. A la derecha se muestran detalles de tinciones con los Acs indicados. Los núcleos están teñidos con TOPRO-3 (azul). Las barras de escala representan 20 μm, excepto en la microfotografía panorámica, que representa 500 μm.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El bajo número de MKs presentes en la BM adulta junto con la fragilidad de estas células de gran tamaño, ha dificultado durante años su aislamiento y su estudio *in vitro*. De hecho, sólo tras el descubrimiento de la TPO y los avances realizados en la generación de diversos modelos de animales modificados genéticamente, ha sido posible un estudio más detallado de las células del linaje megacariocítico, incluida la descripción de los diferentes precursores, su biogénesis, nichos e interrelaciones establecidas con otros tipos celulares presentes en la BM del adulto. De esta forma sabemos actualmente que una célula inmadura, pero ya dirigida hacia el linaje MK, se define en la BM adulta por la expresión de CD41, c-Kit y CD45 (Matsumura-Takeda *et al.*, 2007). Según estas células maduran, negativizan el receptor c-kit y expresan otras moléculas, que permiten su identificación como células CD41⁺⁺c-Kit⁻CD45⁺CD9⁺CD42c⁺CD61⁺⁺Tubulina β -1⁺AcHE⁺ (Matsumura-Takeda *et al.*, 2007). El estadio de madurez de los MKs no sólo viene determinado por su fenotipo, sino también por parámetros tales como el tamaño y abundancia de gránulos en el citoplasma y la ploidía nuclear, que a su vez definen el potencial trombopoyético del MK (de Alarcon y Graeve, 1996; Levine *et al.*, 1996; van der Loo y Martin, 1996; Zimmet y Ravid, 2000). En marcado contraste, la megacariocitopoyesis embrionaria continúa siendo un campo relativamente poco explorado, ya que los estudios que se han llevado a cabo generalmente se han centrado en medir la capacidad que presentan las células dirigidas hacia el linaje MK (estimuladas con TPO) para generar colonias en medio semisólido (Tober *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2001). A pesar de ello se han utilizado células procedentes del FL a partir de E14.5-15.5 como fuente de células no caracterizadas fenotípicamente para cultivos de MKs (Italiano *et al.*, 1999). Durante la gestación, la generación de las células hematopoyéticas, incluidos los MKs, está determinada tanto por características intrínsecas diferenciales de los progenitores embrionarios, como por los microambientes en los que se producen estas células, que son muy diferentes a los que existen en la BM adulta. A esto hay que añadir que el compromiso hacia un determinado destino celular es un proceso altamente regulado por la expresión de factores de transcripción génicos, que deben ser orquestados en una ventana espacio/temporal muy restringida.

Tras una primera onda de hematopoyesis primitiva originada en el YS, y otra ya definitiva con origen independiente en la P-Sp/AGM, el YS y la placenta, el FL es el principal órgano hematopoyético embrio-fetal, y se encuentra sujeto a continuos cambios hasta alcanzar su morfología definitiva, ya en el período postnatal (Dzierzak *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 2002). En el FL los progenitores hematopoyéticos, y los MKs entre ellos, establecen relaciones con células del compartimento epitelial (hepatoblastos y hepatocitos) y con las de otros compartimentos celulares, entre el que destaca el componente vásculo/endotelial. Este componente sufre grandes remodelaciones desde el inicio del desarrollo hepático, proceso en el que participa activamente de

forma independiente al aporte de oxígeno, nutrientes y células sanguíneas (Matsumoto *et al.*, 2001). Todo ello en conjunto, nos ha llevado a abordar el estudio del linaje MK durante los primeros estadios de la formación del hígado y su relación con el resto de células hematopoyéticas, células hepato-epiteliales y células endoteliales.

Las células eritroides y los MKs, de los que se postula que comparten un progenitor común (el progenitor MEP), son los dos primeros linajes hematopoyéticos que se diferencian durante la gestación. La necesidad de una generación temprana de eritrocitos parece deberse a la demanda de oxígeno a consecuencia de la gran cantidad de tejidos generados *de novo* en el embrión, y en este sentido, las hemoglobinas fetales exhiben una mayor afinidad por el oxígeno que las adultas (Ferkowicz *et al.*, 2003; Isern *et al.*, 2008). En cambio no resulta tan evidente la necesidad de contar con MKs en momentos tan tempranos de la vida embrionaria, puesto que la principal función del MK sería el generar PTs, que están fundamentalmente implicadas en coagulación, proceso cuya relevancia es primordial al final de la gestación y durante la vida adulta, pero no tanto durante etapas más tempranas de la vida embrionaria. De hecho, los ratones mutantes NF-E2^{-/-} que carecen o tienen un número muy bajo de PTs, sobreviven hasta el momento del parto, en el que la mayoría muere por hemorragia (Shivdasani *et al.*, 1995b). Resulta llamativo por lo tanto, que los pMKs se encuentren durante los primeros días de formación del FL en números 500 veces superiores en términos porcentuales a los encontrados en condiciones de homeostasis en la BM del adulto, lo que supone que en el hígado embrionario a E11.5 existe prácticamente el mismo número total de células MK que en la BM adulta del ratón ($1,2 \times 10^5$ versus $1,8 \times 10^5$, respectivamente). Este hecho nos llevó a postular que los MKs podrían estar implicados en otras funciones distintas a las convencionalmente descritas de formación de PTs y coagulación.

En general, el método de purificación de MKs ha consistido en una expansión *in vitro* en presencia de TPO durante periodos de tiempo largos (hasta dos semanas) de células inmaduras CD34⁺ de BM, o de células no purificadas de FL, seguida de centrifugación en gradientes de densidad (Pang *et al.*, 2005). En el presente estudio, hemos detectado en el FL a E11.5 una población de células pMK, definidas por una baja expresión de c-Kit junto con la integrina CD49f a niveles elevados, y con marcadores como CD41, KDR, CD9, y CD42c. Estas células han sido purificadas fácilmente por FACS obteniendo de forma rápida una población viable altamente enriquecida en este tipo celular. Es de resaltar que la expresión de la integrina CD49f había sido utilizada por diversos grupos, incluido el nuestro, para la purificación de células pHep, que es otra subpoblación englobada también dentro de las células no hematopoyéticas c-Kit^DCD45⁻ del FL (Suzuki *et al.*, 2000; Minguet *et al.*, 2003). La expresión de CD49f también ha sido descrita en células c-Kit⁺Sca-1⁻Lin⁻ de BM y en células KSL de FL a E14.5 (Qian *et al.*, 2007), participando en el proceso de trans migración de estas últimas desde el FL hacia la BM al final de la gestación. CD49f es la cadena $\alpha 6$ de las integrinas, y junto con la cadena $\beta 1$ /CD29 es receptor, entre otros, de

fibronectina y de laminina, proteínas presentes en las membranas basales subendoteliales de los sinusoides (Georges-Labouesse *et al.*, 1996; Siler *et al.*, 2002), que es precisamente un nicho ocupado por los MKs en la BM y por las células ovales hepáticas (canales de Hering).

Llama la atención que, aunque el fenotipo que hemos definido para las células embrionarias pMK CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ es muy semejante al actualmente aceptado para los MKs del adulto en la BM (CD41⁺⁺CD9⁺CD42c⁺CD61⁺⁺) (Matsumura-Takeda *et al.*, 2007; Nakorn *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 1988), difiere de éste por la ausencia de expresión del marcador panhematopoyético CD45, lo que probablemente ha contribuido a que estas células tempranas no hayan sido identificadas como pertenecientes al linaje MK hasta ahora. Esta ausencia de expresión de CD45 en pMK podría indicar que las vías de diferenciación de MKs en la vida embrionaria serían diferentes de las presentes mayoritariamente en la vida adulta. Para abordar esta hipótesis, purificamos poblaciones de FL a E11.5 en base a la expresión de CD45, KDR y CD41 y realizamos cultivos convencionales en medio semisólido (Methocult) y en medios líquidos, y los analizamos a corto plazo (dos días). De los resultados obtenidos se desprende, en primer lugar, que la población CD45⁺KDR⁻CD41⁻ es la más inmadura, ya que presenta el mayor potencial de diferenciación hacia células formadoras de colonias (mayor número de colonias/célula sembrada) en medio semisólido, y en medio líquido es capaz de generar de nuevo células CD45⁺KDR⁻CD41⁻ junto con otras células de distintos linajes como son el eritroide (obtenemos células Ter119⁺), mielóide (aunque inmaduro, pues genera células con niveles altos de CD45, que co-expresan c-Kit y Mac-1) y megacariocítico, en este caso conservando o disminuyendo los niveles de CD45, y expresando CD41 y CD42c. Estas últimas células tienen un fenotipo muy similar al de la población CD45⁺KDR⁺CD41⁺ presente *ex vivo*, lo que nos indicaría que una de las vías para producir MKs en el embrión pasaría por la adquisición de KDR y CD41 a niveles bajos, como se ha descrito en el caso de MKs en maduración terminal (aunque células tronco quiescentes también expresan estos marcadores a bajos niveles, perdiéndolos en el proceso de diferenciación) (Casella *et al.*, 2003; Katoh *et al.*, 1995). Al cultivar estas células CD45⁺KDR⁺CD41⁺ purificadas a partir de la población *ex vivo*, se obtienen mayoritariamente células de linaje megacariocítico, que co-expresan CD41 y CD42c, y prácticamente no se detectan en los cultivos líquidos células eritroides o mieloides Mac-1⁺. Es de destacar que las células purificadas CD45⁺KDR⁺CD41⁺, que inicialmente expresan CD45, lo pierden en cultivo. Este hecho parece reflejar los fenómenos que ocurren en la diferenciación de MKs observada *in vivo* en el embrión a E11.5, pues la población obtenida *ex vivo* CD45⁻KDR⁺CD41⁺⁺ (que como hemos mostrado es también CD49f^Hc-Kit^D y CD42c⁺CD61⁺) y que no expresa CD45, al ser puesta en cultivo parece estar comprometida únicamente hacia el linaje MK, negativizando CD49f y KDR, y en ningún momento vuelve a adquirir CD45. En cualquier caso, hemos descartado que esta bajada en la expresión de CD45 que observamos *in vitro* se deba a algún artefacto debido al proceso de purificación, o a una mortalidad preferencial inducida por éste. Además esta

disminución no se observa en otras poblaciones de tipo mieloide que se detectan en los cultivos paralelos de las poblaciones $CD45^{+}KDR^{-}CD41^{-}$ y $CD45^{++}KDR^{-}CD41^{-}$, en las que de hecho aumenta la expresión de CD45 al adquirir otros marcadores como CD11b/Mac-1, a pesar de tratarse éstas de células inmaduras que todavía mantienen c-Kit. En la diferenciación de MKs descrita en individuos adultos, la molécula CD45 se expresa desde momentos muy tempranos y es negativa en PTs, pero se desconoce el estadio preciso en el que los MKs adultos $CD45^{+}$ dejan de expresar esta molécula, aunque presumiblemente debe de ser muy cercano a la producción de PTs. De hecho, las células K562 (MK) reducen en su diferenciación final a MKs su actividad fosfatasa, que se debe a una proteína tirosin-fosfatasa con estructura idéntica a CD45 (Butler *et al.*, 1990). Por último, las células $CD45^{++}KDR^{-}$ purificadas del FL a E11.5 y puestas en cultivo, producen muy pocas colonias en medio semisólido, pero en cultivo líquido no se detectan células $CD45^{+}KDR^{-}CD41^{-}$ ni células eritroides. Estas células generan dos tipos celulares, uno mieloide que mantiene altos niveles de CD45 y adquiere Mac-1, y otro con un menor nivel de expresión de CD45 y, sorprendentemente, positividad para CD41 y CD42c, lo que las asemeja a la población ya comprometida a linaje megacariocítico $CD45^{+}KDR^{+}CD41^{+}$ mencionada más arriba.

Por tanto, en el hígado de embriones a E11.5 se identifican dos vías separadas para generar MKs, una de ellas se produce a partir de la población de células $CD45^{++}KDR^{-}$, con potencial mieloide y megacariocítico, y la otra se produce directamente a partir de células oligopotenciales más inmaduras $CD45^{+}KDR^{-}CD41^{-}$. En cualquier caso a E11.5, sea cual sea la vía por la que se generan los MKs, éstos pasan por un estadio $CD45^{+}$ (y $KDR^{+}CD41^{+}$), y se convierten en $CD45^{-}$ al adquirir CD42c (figura D-1). Se ha descrito que CD45 modula las señales procedentes de receptores de integrina y citoquinas y por lo tanto el nivel de sensibilidad a estímulos externos (Hermiston *et al.*, 2003), lo que puede estar en relación con que los pMKs a E11.5 no expresen este receptor tirosin quinasa durante este estadio del desarrollo. Cabe mencionar que las HSC embrionarias inmaduras tampoco expresan CD45 hasta E11.5 en el FL (Bertrand *et al.*, 2005; Matsubara *et al.*, 2005). Sin embargo, a E15.5 hemos observado que la mayoría de MK fetales expresan ya CD45 (dato no mostrado), de forma similar a lo que ocurre en el adulto. Por otra parte, células mieloides en las que se elimina la expresión de CD45 a través de la delección del factor de transcripción PU.1, presentan defectos en adhesión, quimiotaxis, y fagocitosis, entre otros (Anderson *et al.*, 2001). Es interesante que la población de pMKs no exprese tampoco CXCR4, receptor implicado en la migración de MKs y HSCs en la BM adulta desde el nicho osteoblástico al vascular (Ara *et al.*, 2003), y desde el FL hacia la BM (en el embrión), lo que puede deberse a la falta de necesidad de los pMKs fetales de migrar hacia el nicho vascular, puesto que el FL es un órgano altamente vascularizado (Mazharian *et al.*, 2009). Además aunque la expresión de CXCR4 aumenta con la maduración celular, sólo es funcional en los MK más inmaduros en BM (Riviere *et al.*, 1999) y la inactivación génica de su ligando SDF-1 no afecta al número de progenitores mieloides en el FL (Nagasawa *et*

al., 1996). Por lo tanto la falta de expresión de CD45 y de CXCR4 podría actuar como un mecanismo de retención de las células en el FL, impidiendo su salida hacia el torrente sanguíneo y evitando procesos de coagulación y de secreción de otros factores de crecimiento, y tal vez también permitiendo un mayor efecto de los MKs sobre otros componentes celulares hepáticos y *viceversa*.

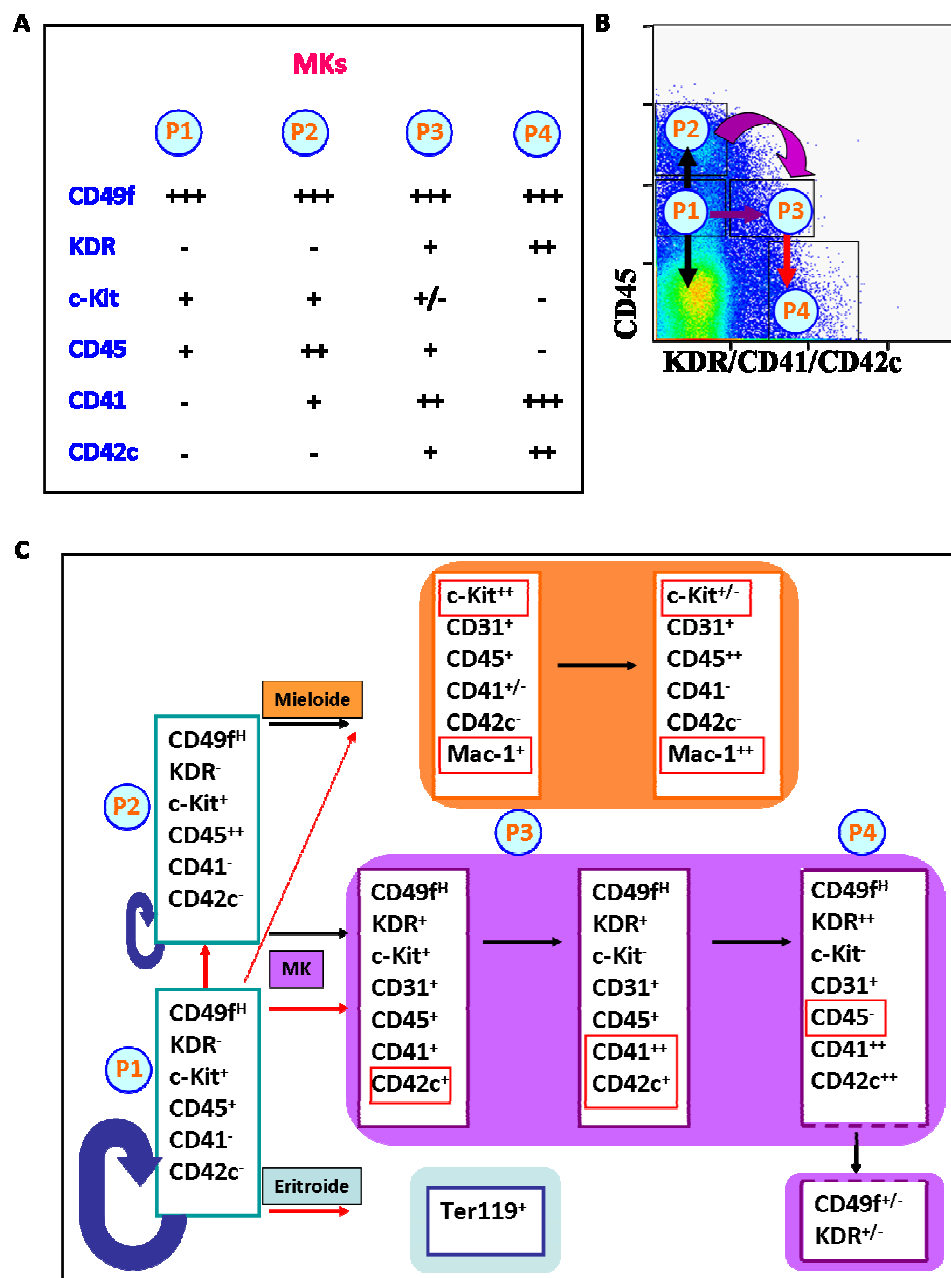


Figura D-1.- Vías de diferenciación del linaje megacariocítico en el FL a E11.5. A) Marcadores de superficie de los pMKs en su proceso de diferenciación. P1-P4 son diferentes progenitores identificados en el FL. B) Esquema de diferenciación de MKs propuesto *in vivo* en el FL a E11.5. C) Resumen esquemático del potencial de diferenciación *in vitro* de los progenitores P1-P4 aislados de FL11.5. Los marcadores más relevantes que definen el cambio de cada subpoblación se resaltan en rojo. P1 y P2 (recuadros turquesas) diferencian hacia células mieloides (recuadros naranjas), MKs (recuadros morados) y Ery (sólo P1; recuadro azul). P3 y P4 indican poblaciones diferenciadas *in vitro* con un fenotipo equivalente al de las mismas poblaciones observadas *in vivo*. P1 flechas rojas; P2 flechas negras.

Como ya se ha mencionado, durante la gestación y de forma multicéntrica, existen dos ondas de generación de células hematopoyéticas (primitiva y definitiva), encontrando que células derivadas de ambas conviven durante un periodo de tiempo de la gestación. El hecho de encontrar varias vías para generar MKs podría ser reflejo de la existencia de ambas ondas. En el caso del linaje MK es difícil discernir a E11.5 que células proceden de la onda primitiva y cuáles de la definitiva, puesto que no existe un marcador diferencial entre ambos tipos de células, como ocurre en el caso de los eritrocitos con las diferentes clases de hemoglobina sintetizadas. Nuestros resultados nos hacen pensar que los MKs generados a E11.5 en el FL proceden de la onda definitiva, ya que estas células, a diferencia de pMKs ubicados en otras localizaciones hematopoyéticas simultáneas, como son el YS, AGM o PBL, presentan un fenotipo más inmaduro, definido por su menor nivel de expresión de CD42c, CD41 y mayor expresión de c-Kit y CD105. Apoyando esta hipótesis encontramos que los ratones deficientes en la expresión de Runx-1/AML-1, en los que no hay hematopoyesis definitiva, carecen de células hematopoyéticas a excepción de eritrocitos primitivos, no detectándose la presencia de MKs ni PTs en el FL11.5, y demostrando por lo tanto que los MKs presentes en este órgano en este día de gestación dependen de la expresión de Runx-1 (Okuda *et al.*, 1996). Además en nuestro estudio hemos podido objetivar que los pMKs presentes en el FL, manifiestan una expresión anómala de proteínas hepato-específicas (ALB, AFP, TTR) y de proteínas características de células indiferenciadas, entre las que destacan la expresión de nestina y de CD105 (endoglina). La expresión de ALB, indicador de diferenciación hepática (sólo los hepatocitos adultos la sintetizan), fue detectada mediante PCR y PCR-TR en los pMKs, aunque a un nivel menor que en el caso de los pHep. Este resultado concuerda con los descritos previamente por Chen y cols. (Chen *et al.*, 2007) en los que se detecta, mediante ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*), expresión no sólo de ALB sino también de AFP y TTR a bajos niveles en células de FL14.5 diferenciadas a MK por la adición de TPO. Al parecer esta síntesis de ALB no estaría sólo restringida a los MK y a sus derivados, las PTs (Kieffer *et al.*, 1987), sino que existen cada vez más evidencias que apuntan a la expresión de ALB en otros tipos celulares, generando un intenso debate sobre si la expresión de la misma es un buen indicador de diferenciación hepática, sobre todo en ensayos de transdiferenciación. Así, en un estudio reciente, (Lian *et al.*, 2006) se ha detectado expresión génica de ALB, AFP y CK18 en HSC Lin⁻ de BM. En concreto, son las células Lin⁻ c-Kit⁺ las que expresan ALB, mientras que las células Lin⁻ c-Kit⁻ son capaces de expresar AFP y CK18, pero no ALB. En ningún caso, incluso en condiciones de promoción hepática, se ha detectado expresión de AAT, un indicador de madurez hepática. Por lo tanto, cabe pensar que la síntesis de ALB en HSC y en particular en MKs en BM, podría ser una expresión vestigial “heredada” de su paso por el FL, ya que los pMK fetales extrahepáticos a E11.5, con un fenotipo más maduro (presentan menores niveles de c-Kit) presumiblemente por su procedencia de la onda primitiva, no expresan ALB. Por otra parte nosotros dejamos de detectar expresión génica de ALB tras 7 días de cultivo

(transwell), aunque si que observamos expresión a nivel de proteína, sugiriendo la existencia de endocitosis en los MKs de estos cultivos como ha sido descrito (Handagama *et al.*, 1989).

Diversos estudios muestran que las SC más inmaduras no son genéticamente inertes, sino que mantienen unos niveles bajos, pero constantes y dinámicos, de expresiones genéticas selectivas (a veces, denominados como “lineage promiscuity”). A partir de este “ruido de fondo” genético los diferentes linajes celulares se van estableciendo a consecuencia de procesos estocásticos y/o de selección, quizás nicho-específicos, de progenitores en los que dominan unos patrones moleculares sobre otros. De este modo, la restricción a un linaje estaría basada preferencialmente en el “apagado” de otros programas genéticos alternativos (Lai y Kondo, 2006). Existe una estrecha relación en el desarrollo de HSC y MKs, en relación a otros linajes celulares hematopoyéticos, como se muestra, ya que ambas células comparten múltiples aspectos moleculares y funcionales, tales como la utilización de la señalización TPO/c-Mpl para proliferación de HSC y proliferación/diferenciación de MKs (Huang y Cantor, 2009). En el caso de las células pMKs $CD49^Hc\text{-Kit}^D CD45^-$ no sólo comparten la expresión de marcadores con células tronco, (c-Kit, CD105 y nestina) sino también con células endoteliales (CD31, KDR o vWF). De esta forma, nos encontramos ante unas células $CD45^+ KDR^+ CD41^+$ muy abundantes en el FL11.5 y que parecen estar más cerca de las HSC que otros linajes hematopoyéticos, haciendo plausible el hecho de que las HSC, en el camino hacia su diferenciación a diversos linajes, tomen como una decisión inicial el ir hacia el linaje MK. Estos datos, y los de otros grupos (Chang *et al.*, 2007; Forsberg *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2009), apoyarían el modelo propuesto recientemente por Jacobsen (Mansson *et al.*, 2007) de generación de linajes hematopoyéticos a través de progenitores de los que progresivamente se separan células con potencial ya definido, quedando las células originales todavía con gran número de potencialidades “abiertas” (LMPP), más que el modelo clásico alternativo, propuesto por el grupo de I.R. Weismann, en el que se produciría una toma de decisiones excluyentes a través de progenitores bipotenciales como el CMP y el CLP (Akashi *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 1997). De hecho, es posible que ambos tipos de diferenciación co-existan en la BM adulta. En nuestro caso, no podemos excluir completamente que, aunque minoritarios, en el FL de E11.5 existan también progenitores oligopotenciales semejantes al CMP (aunque con fenotipo diferente ya que serían $c\text{-Kit}^+ CD105^+$), que estarían dentro de la población $CD45^{++} KDR^- CD41^-$, puesto que generan células mieloides $Mac\text{-}1^+$ y MKs $CD42c^+$ y los estudios de diferenciación linfoide que llevamos a cabo con esta población celular sobre células estromales OP9, fueron negativos inicialmente (datos no mostrados). Ensayos a nivel clonal, en cultivos y en análisis de patrones de expresión génica, permitirán clarificar este punto.

Un aspecto relevante en la diferenciación megacariocítica consiste en el estudio de la formación de proPTs como mecanismo *in vitro* de biosíntesis de PTs. Los cambios morfológicos experimentados por estas células, así como los mecanismos moleculares implicados en este

proceso son de gran interés, ya que ayudan a dilucidar cómo se generan las PTs *in vivo* y, por lo tanto, a encontrar posibles dianas terapéuticas en enfermedades en las que existen disfunciones plaquetarias tanto por defecto (ya sean genéticas, como el Síndrome de Bernard-Soulier o la trombastenia de Glanzmann, o adquiridas) como por exceso, en las que se origina una trombocitosis y aumento de la coagulación (enfermedades mieloproliferativas, como la trombocitemia esencial y la policitemia vera) (Patel *et al.*, 2005). En el transcurso de nuestra investigación, hemos observado que las células pMK de FL11.5 presentan diferentes estadios en su diferenciación hacia células formadoras de proPTs. Tras el proceso de purificación, en ausencia de TPO y en tan sólo unas horas, podemos observar como algunas células, inicialmente redondas, comienzan a adherirse (a veces totalmente y otras sólo parcialmente) y a presentar movimientos que les permiten adoptar una morfología fusiforme, estadio que hemos definido como WL, siendo el tipo celular más abundante a las 24 horas de cultivo. En este momento, las células realizan movimientos rápidos, establecen contactos con células vecinas, e incluso pueden volver a adoptar una morfología esférica. Los cultivos son asincrónicos, por lo que a las 48 horas se observa la aparición de células formadoras de proPTs, a la vez que siguen viéndose células WL, aunque en menor número. El hecho de que ambos tipos de células expresen CD41 y CD42c sugiere que no estamos ante una población heterogénea, sino ante células MK en distinto estadio de diferenciación, dato que se ratifica mediante video-microscopía a tiempo real, objetivándose la transformación de las células WL en células portadoras de proPT. Trabajos previos con MKs muestran la generación de proPTs en cultivos a tiempo real, pero a pesar de que en algunos vídeos se pueden observar células semejantes a las definidas por nosotros como WL, no hemos encontrado menciones de la existencia de las mismas como un estadio intermedio en este proceso (Dunois-Lardé *et al.*, 2009). La generación de proPTs se inicia con la emisión de uno o dos pseudópodos, que poco a poco van alargándose y afilándose, adquiriendo la morfología típica de una proPT. A los 5-6 días de cultivo, la mayoría de células se ha transformado, presentan hasta 5 proPTs/célula y éstas apenas tienen ramificaciones. A diferencia de los descritos en este trabajo, los estudios con MKs procedentes de BM o de FL14.5, que generalmente se llevan a cabo en presencia de TPO, muestran que se tarda más tiempo en generar proPTs, y el número de proPTs/célula que se obtiene, así como de ramificaciones/proPT es elevado (Miyazaki, 1996). Las diferencias encontradas entre las células CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻ a E11.5 y las células MK de FL14.5 o de BM, podrían ser debidas en parte a que los MK presentes en el hígado a E11.5 son más inmaduros, con menor tamaño y menor grado de ploidía, y en consecuencia generan un número de PTs menor. Este hecho está de acuerdo con la observación por la cual en trasplantes con células CD34⁺ de origen fetal o de cordón umbilical existe un retraso en la recuperación del número de PTs (Bornstein *et al.*, 2001). Por otro lado, las células del embrión a E11.5 presentan mayor grado de proliferación *ex vivo* (Figura R-26 y datos no mostrados), lo que hace innecesaria la adición de TPO.

De hecho, al añadir TPO a los cultivos de células $CD49^{\text{H}}\text{c-Kit}^{\text{D}}CD45^{-}$ se observa un aumento en el número de células totales (tal vez debido al efecto descrito de la TPO en prevención de apoptosis (de Sauvage *et al.*, 1994), un retraso en la aparición de células con proPTs y un aumento en el número de células ADH, en un efecto muy similar al producido en los mismos cultivos por el colágeno I. Este dato está en relación con la expresión que hemos observado de CD49b/DX5, que junto a GPVI actúa como receptor de colágeno, molécula presente en áreas periendoteliales. Además, la TPO aumenta el tamaño celular, probablemente debido a un aumento en la ploidía como ha sido previamente descrito.

La tubulina $\beta 1$ y el citoesqueleto de actina juegan un papel clave en la emisión de las proPTs, y la actina también está implicada en el proceso de ramificación proplaquetar (Hartwig e Italiano, 2006; Italiano *et al.*, 1999). En el caso de las células $CD49^{\text{H}}\text{c-Kit}^{\text{D}}CD45^{-}$ la adición al inicio del cultivo de citocalasina B, un inhibidor de la polimerización de actina, produjo la inhibición no sólo de la generación de proPTs sino también de la aparición de células WL, mostrando así la dependencia de actina-F ya en los procesos más tempranos de la emisión de proPTs. Se han postulado diversas teorías acerca de cómo se generan las PTs *in vivo*. La teoría de la formación de proPTs, fenómeno descrito durante varios años únicamente *in vitro*, ha ido ganando fuerza desde que en el 2007 Junt y cols. (Junt *et al.*, 2007) obtuvieron imágenes *in vivo* de la presencia de las mismas en la BM de ratones adultos tratados con TPO, aunque estos experimentos no descartan que existan otros mecanismos adicionales de formación de PTs, como la división del citoplasma en territorios plaquetares y la posterior fragmentación del mismo. El hecho de que, en un corto período de tiempo, las células embrionarias $CD49^{\text{H}}\text{c-Kit}^{\text{D}}CD45^{-}$ de E11.5 produzcan proPTs *in vitro* en ausencia de TPO, junto a la detección de las mismas en células aisladas *ex vivo* (ver figura R-11), y a la presencia descrita de PTs circulantes ya a E10.5 (Tober *et al.*, 2007), nos hizo plantearnos la posibilidad de localizar la existencia de células con proPTs *in vivo*. Así, mediante marcapos de microscopía confocal trazando los MKs con CD41 y haciendo reconstrucciones 3D, detectamos la presencia de células $CD41^{+}$, que por lo general se encuentran aisladas o en grupos de 2-3 células, y en íntimo contacto con células endoteliales Tie-2^{+} , mimetizando así lo que ocurre en BM. Esta asociación de células $CD41^{+}$ con células endoteliales en el hígado en formación podría estar en relación con su papel como potenciadores de la angiogénesis, como ha sido descrito, y posiblemente también con la producción de PTs hacia el torrente sanguíneo. De hecho, hemos verificado que el mecanismo de emisión de proPTs ocurre en el FL a E11.5, observándose también la presencia de microprolongaciones pseudopodiales más pequeñas, de las que se desprenden micropartículas. Estas microprolongaciones son resistentes a la inhibición del ensamblaje de microtúbulos y aumentan en número cuando se inhibe la polimerización de actina (Flaumenhaft *et al.*, 2009), y se han descrito como implicadas en procesos tales como angiogénesis (Kim *et al.*, 2004), comunicación celular (transferencia de receptores como CXCR4, PAR-1 y ligandos como

CD40L y PF4, Baj-Krzyworzeka *et al.*, 2002), quimiotaxis e injerto/homing de células HSC (Janowska-Wieczorek *et al.*, 2001). Los contactos celulares establecidos por los MKs presentes en el FL, a través de estas microprolongaciones y de las más largas proPTS, con células de otros linajes hematopoyéticos y epiteliales, así como la secreción de factores de crecimiento tales como VEGF-A, serotonina, HGF, etc, sugieren que puedan tener un papel en comunicación celular. En concreto, hemos observado el establecimiento específico de contactos de células progenitoras inmaduras c-Kit⁺ (sobre todo en la periferia del FL) y células ALB⁺ (cerca de los vasos). Este hecho se ve reflejado en la dependencia, en cultivos *in vitro*, de la presencia de células pMK para la supervivencia de las células pHep (CD49f^Dc-Kit^DCD45⁻) y el establecimiento de capas hepato-epiteliales. Tal es así, que no basta con la presencia de factores solubles procedentes de pMKs sino que es necesaria la existencia de un contacto celular para que tenga lugar la óptima promoción hepática. En el mismo sentido apuntan los resultados encontrados en ratones adultos sometidos a hepatectomía, tras la que se observa la acumulación de PTs en el hígado (que migran desde el espacio sinusoidal al espacio de Disse, lugar donde también se localizan las células ovaes), promoviendo la regeneración hepática (Nakamura *et al.*, 1998), y la observación de una correlación entre éste proceso y el número de PTs (Murata *et al.*, 2007). Para que la óptima regeneración hepática tenga lugar, el contacto directo entre PTs y hepatocitos permite que estos últimos proliferen, iniciándose una cascada de señales de activación de factores de crecimiento entre los que destacan HGF, VEGF, IGF-1, PDGF y serotonina, que las PTs liberan de los gránulos α y densos, respectivamente (Lesurtel *et al.*, 2006; Matsuo *et al.*, 2008). Por otra parte, las PTs activadas por trombina también liberan PDGF, HGF, IGF y VEGF, promoviendo proliferación hepática incluso sin contacto directo entre PTs y hepatocitos. En nuestro caso, la adición de sobrenadantes procedentes de cultivos de pMKs, así como de VEGF-A, a cultivos de pHep resultó en un incremento parcial de la síntesis de ALB y en un aumento en la formación de capas epiteliales. Por el contrario, la adición de serotonina no tuvo efectos sobre la síntesis de ALB ni en la formación de placas epiteliales por encima de los niveles expresados por células pHep sin co-cultivar. Es sabido que las PTs y los MKs presentan distintos subtipos de gránulos α en función de los factores que almacenan, encontrando así gránulos con factores pro-angiogénicos (VEGF-A, fibrinógeno y trombospondina 1) y otros con factores anti-angiogénicos (endostatina, vWF, FGFb y TGF- α) (Italiano *et al.*, 2008). Para finalizar el proceso de regeneración tras hepatectomía se requiere TGF- α (Clavien *et al.*, 2007), siendo plausible que las PTs y por ende los MKs, orquesten la regeneración a través de la estimulación e inhibición controlada de señales relacionadas con el crecimiento. Recientemente se han publicado varios trabajos en los que las PTs actúan como factores clave, no sólo en reparación tisular, sino también en morfogénesis. Por ejemplo, contribuyen al cierre postnatal del ducto arterioso (promueven el sellado mediante la formación de un trombo y apoyan la remodelación del lumen vascular; Echtler *et al.*, 2010) y son primordiales en la separación de la circulación sanguínea y linfática durante el

desarrollo al formar una barrera estructural entre ambas (Carramolino *et al.*, 2010; Uhrin *et al.*, 2010).

Todos estos datos apuntan a los MKs y PTs como elementos esenciales durante el desarrollo, aunque paradójicamente los animales deficientes en diversos factores implicados en la generación de MKs y PTs presentan fenotipos desiguales, tal vez debido a la existencia en ellos de progenitores más o menos comprometidos al linaje megacariocítico, y con capacidad ya de mantener algunas de las funciones de los MKs maduros, como es el caso del mutante p45 NF-E2, que presentan un bloqueo en los estadios finales de maduración megacariocítica. Los animales deficientes en ese factor presentan un menor tamaño, y sólo el 10% sobrevive al parto, en el que mueren por hemorragia. Se ha descrito que estos ratones NF-E2^{-/-} retienen cierta actividad hemostática que depende de debris megacariocíticos circulantes (micropartículas derivadas de los MKs) que previenen en parte el sangrado durante la gestación (Shivdasani *et al.*, 1995b), permiten la remodelación tisular (Levin *et al.*, 1999), y participan así por ejemplo en el cierre del ducto arterioso. Mientras, los mutantes PAR1^{-/-} o TF^{-/-} (*tissue factor* o protrombina) en los que sí que hay PTs, mueren a mitad de la gestación por hemorragia, ya que las PTs no pueden ser activadas (Palumbo *et al.*, 2004). En el otro extremo, los animales deficientes en factores de transcripción que afectan a la generación temprana de progenitores de la hematopoyesis primitiva (SCL/TAL, RBTN2) mueren temprano por anemia (Shivdasani *et al.*, 1995a; Warren *et al.*, 1994), y de la definitiva (Runx-1/AML1, CBPs, GATA-2) son letales a partir de E11.5, generalmente por anemia y/o hemorragias (Okuda *et al.*, 1996). En mutantes carentes de factores específicos de linajes hematopoyéticos, es frecuente que los MKs estén selectivamente mantenidos (PU-1, GATA-3, c-myc) (Pandolfi *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1994; Tober *et al.*, 2008), o incluso incrementados (c-myc) (Guo *et al.*, 2009). El fenotipo de los ratones deficientes en el factor Fli-1, necesario para el desarrollo vascular y de MKs, es letal a E11.5, debido a defectos en la integridad vascular y a una megacariocitopoyesis anormal, con alteraciones en la proliferación de los hepatocitos y apoptosis del endotelio vascular (Hart *et al.*, 2000). Por lo tanto es posible que, durante el desarrollo embrionario-fetal, los MKs estén participando a través de las proPTs y las microprolongaciones por una parte en el desarrollo del FL, promoviendo la proliferación y diferenciación de las células pHep, y por otra actúen como agentes potenciadores de angiogénesis. El VEGF y sus receptores VEGFR1/Flt1 y VEGFR2/KDR/Flk1 están implicados en angiogénesis y vasculogénesis (Casella *et al.*, 2003), y se expresan en MK inmaduros y maduros, respectivamente. Podría existir una red de señalización/comunicación triangular formada por MK, pHep y células endoteliales (ver figura D-2). Los MK producen factores como HGF, VEGF y PDGF, promoviendo el crecimiento de pHep y células endoteliales, y factores que modulan el estado de los vasos como la serotonina (constricción). Los pHep por su parte producen también VEGF, que promueve el desarrollo de células endoteliales y MKs a través del KDR presente en ambos tipos celulares, y TPO (el hígado es el principal sitio de

producción) que actuaría sobre los progenitores MK y sobre HSC a través del c-Mpl. A su vez las células endoteliales son esenciales para el desarrollo hepático (Matsumoto *et al.*, 2001) y producen HGF y VEGF que actúan sobre pHep y MK, respectivamente (LeCouter *et al.*, 2003). Múltiples trabajos aluden a la relación entre MKs y células endoteliales en BM. Cabe destacar que las células endoteliales del FL y de la microvasculatura de la BM presentan una serie de características que las diferencia de las del resto de órganos y de las HUVEC (células endoteliales de cordón umbilical humano), tales como que son inductores más potentes de la adhesión de HSC y de su migración (Kiel *et al.*, 2005a), expresan niveles más bajos del vWF (Zucker-Franklin y Philipp, 2000) y expresan constitutivamente citoquinas y moléculas de adhesión tipo VCAM-1 y E-Selectina (Almeida-Porada y Ascensao, 1996; Schweitzer *et al.*, 1996). Nosotros observamos *in vivo* una expresión diferencial de vWF, mucho más baja, en el FL y en corazón que en el resto de tejidos del embrión. Es de interés que los sinusoides hepáticos se encuentran rodeados por una matriz rica en laminina 1, situando así los MKs en sus alrededores, puesto que expresan CD49f. No olvidemos que es en los sinusoides hepáticos donde se produce el intercambio de solutos, nutrientes y oxígeno y también la secreción de proteínas hepáticas hacia la circulación sanguínea. Finalmente, el resto de células hematopoyéticas presentes en el FL también ejercen un papel en la maduración hepática, al producir también HGF, VEGF (cuyo nivel se ve potenciado por TPO; Bobik *et al.*, 1998) y OSM. Ésta última actúa no sólo sobre pHep (Kinoshita *et al.*, 1999) sino también sobre MKs, promoviendo la producción de PTs (Wallace *et al.*, 1995). De hecho, se ha descrito que la delección de c-myc selectivamente en células hematopoyéticas en embriones de ratón, produce una ausencia de células hematopoyéticas definitivas, defectos en el proceso de remodelación angiogénica y una hipoplasia hepática, demostrando así la importancia de la interacción de estos tipos celulares en el desarrollo hepático (He *et al.*, 2008).

El microambiente en el que se generan las células hematopoyéticas es indudablemente un factor clave para el establecimiento de focos de hematopoyesis. De esta forma en la BM adulta encontramos dos grandes nichos, el nicho osteoblástico y el vascular. El primero, en contacto directo con el endósteo, representa un microambiente favorecedor del mantenimiento de HSC en un estado relativamente quiescente e inmaduro. De forma análoga, diversos estudios aluden a la importancia del epitelio celómico que tapiza las superficies de distintos órganos, entre los que se encuentra el FL, en la morfogénesis de este último. Así encontramos en la literatura que este mesotelio, que dará lugar a la cápsula de Glisson, expresa a E11.5 altos niveles de factores de transcripción implicados en morfogénesis hepática, como N-myc (Giroux y Charron, 1998), WT-1, ácido araquidónico y enzimas implicadas en su metabolismo (Ijpenberg *et al.*, 2007). Los ratones mutantes defectivos para estos factores presentan hipoplasia hepática, debido a hipoproliferación de hepatocitos y aumento de la apoptosis, reducción en el número de lóbulos y también en el número de eritroblastos. Este último caso puede ser explicado por la reducción de EPO debido a la

ausencia de WT-1, del que EPO es diana transcripcional (Dame *et al.*, 2006). Además existen evidencias de la contribución de este epitelio celómico a la formación de sinusoides hepáticos (Perez-Pomares *et al.*, 2004) y se ha postulado que puede ser una fuente de células estrelladas (Ijpenberg *et al.*, 2007).

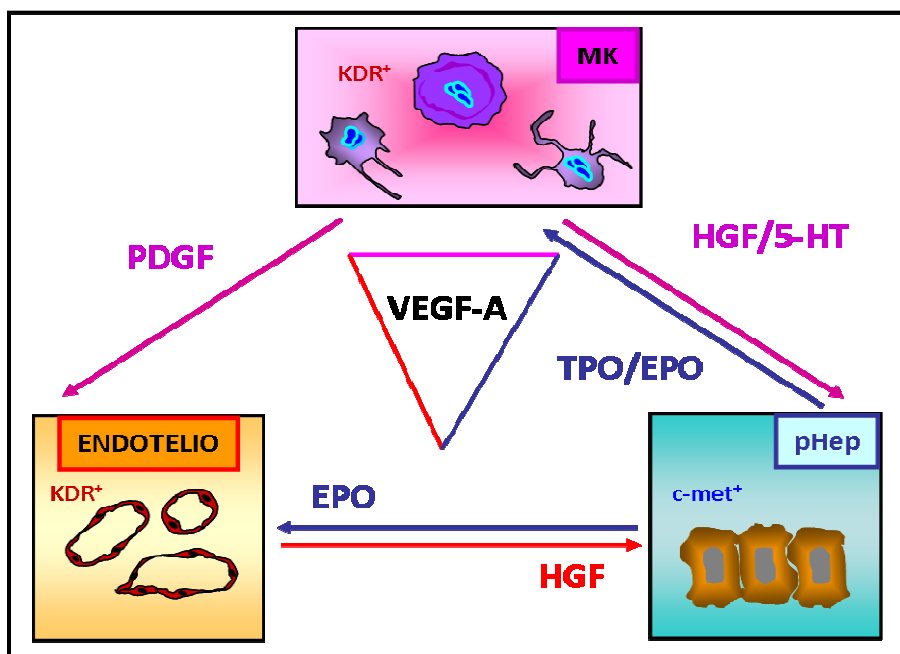


Figura D-2.- Esquema de las relaciones establecidas entre el componente vascular, el hepato-epitelial y los MKs en el FL11.5. Se resumen las interacciones establecidas entre el endotelio (KDR⁺, flechas rojas), los MKs (KDR⁺, flechas rosas) y los pHep (c-Met⁺, flechas azules), y los factores a través de los cuales actúa cada componente. 5-HT (serotonina).

Un aspecto todavía en discusión es cómo se produce el crecimiento hepático y cuáles son los mecanismos que lo regulan. En un intento de aportar datos a este proceso, hemos subdividido el FL en dos zonas, periferia y centro, y hemos contabilizado el número de progenitores c-Kit⁺ y c-Kit⁺ALB⁺ presentes en cada zona. A E11.5 existe un gran número de progenitores c-Kit⁺, que están preferentemente localizados en la zona central del órgano, tal vez reflejando una llegada más tardía al FL que la de otros linajes celulares pertenecientes a ondas extrahepáticas que lo colonizan antes, como son los Ery-P, y que pueden expandirse *in situ*. Al avanzar la gestación, el número de células c-Kit⁺ disminuye progresivamente, a la vez que se desplazan desde el centro a la periferia hepática a E12.5. Este cambio sugiere que en este momento el FL crece fundamentalmente por su zona periférica, que es donde se sitúan los progenitores más inmaduros y las células del parénquima más diferenciadas, con mayores niveles de ALB, se sitúan en el centro del órgano, cerca de los vasos y fuera de la banda submesotelial más madura, como está descrito en estudios previos (Suksaweang *et al.*, 2004). Sin embargo, a diferencia de otros trabajos (Ijpenberg *et al.*, 2007; Suksaweang *et al.*, 2004), nosotros no hemos podido establecer diferencias significativas en

los niveles de células en proliferación entre diferentes zonas del FL, aunque hemos objetivado que a E11.5, el FL y en concreto sus componentes mayoritarios, las células c-Kit y Ter119, son los linajes que mayor incorporación de EdU presentan. En este sentido hay que tener en cuenta que la elevada tasa de proliferación total del hígado a E11.5 dificulta enormemente el extraer conclusiones claras con la metodología de marcaje *in vivo* utilizada. Estamos intentando acortar los tiempos del pulso de EdU para reducir el número de células proliferantes.

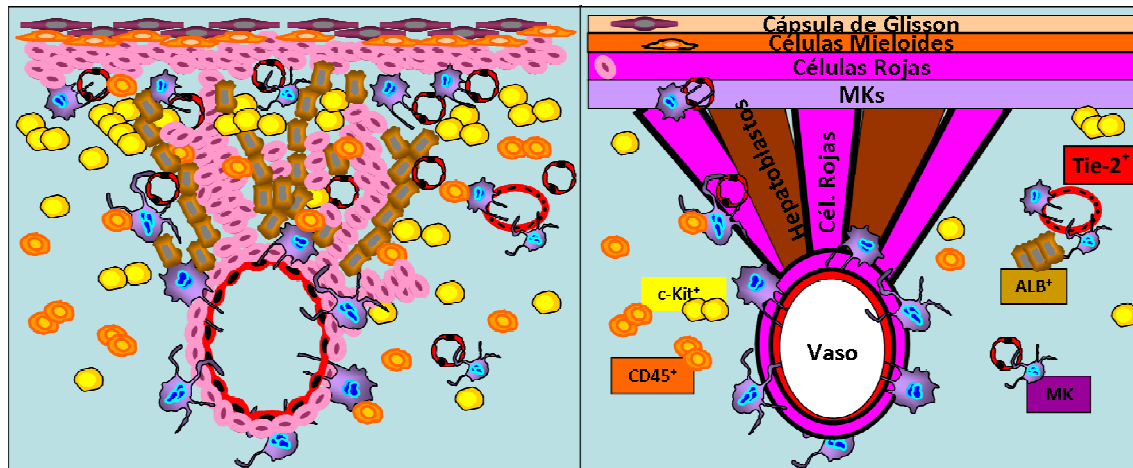


Figura D-3.- Vista esquemática y modelo de organización celular propuesto en el FL a E11.5. Los MKs hepáticos están siempre en contacto con células endoteliales Tie-2⁺ tanto en la área periférica como en la central. El área periférica del FL, de la cual están excluidos los progenitores celulares c-Kit⁺ y las células ALB⁺, está formada por una monocapa de células mieloides CD45⁺, seguida de células Ery y MKs asociados a pequeños capilares. En el resto del parénquima hepático se definen áreas enriquecidas en células Ery y pHep, que parten radialmente desde los grandes vasos centrales, que se encuentran rodeados por coronas de MKs.

Al contrario que en la BM, poco se sabe a cerca de cómo se organizan los diferentes tipos de células hematopoyéticas en el FL. Los estudios *in vivo* realizados en este trabajo nos han permitido definir un modelo de arquitectura celular para el FL entre E11.5-E15.5, que se esquematiza en la figura D-3. En este modelo, los eritrocitos (Ery), tipo celular mayoritario en el FL11.5, ocupan preferencialmente una localización perivascular. Este dato no es de extrañar dada la capacidad que tienen los Ery, como los MKs, para producir factores angiogénicos, postulándose que ambos tipos celulares, junto con células estromales, establecen gradientes de VEGF en el microambiente de la BM (Casella *et al.*, 2003). Desde los vasos, los Ery parten radialmente hacia la periferia hepática, dejando espacios que son ocupados principalmente por células ALB⁺, las cuales parecen disponerse en pequeñas hileras de células poligonales a E10.5-11.5 para más tarde crecer y organizarse, estableciendo contacto con los sinusoides y grandes vasos hepáticos. Los eritrocitos representan diferentes estadios de desarrollo (generalmente nucleados) y cerca de células CD45⁺F4/80⁺, formando lo que parecen primordios de islotes eritroblásticos, lo que supone la primera evidencia de la existencia de éstos antes de E14.5 (Sasaki y Iwatsuki, 1997). Por otra parte

hemos podido confirmar que el FL es el principal sitio de maduración eritroide intraembrionaria a esta edad gestacional, hecho ya sugerido (Isern *et al.*, 2008), ya que pocos eritrocitos inmaduros salen a la circulación sistémica, indicando la existencia de algún mecanismo de atracción de las células eritroides (y también mieloides) inmaduras en el FL, o una posible barrera o filtro que impida su salida.

Las células CD45⁺, que a E11.5 en el FL son mayoritariamente de linaje mieloide y se encuentran generalmente formando dupletes dispersos en el parénquima hepático, pasan a situarse cerca de los vasos en días posteriores del desarrollo. Estas células presentan aspectos morfológicos dispares, según la zona en la que asientan: unas son alargadas, tipo fibroblasto, que se sitúan en una banda en la periferia del FL e interpuestas en la cápsula de Glisson, de forma semejante a las células CD45⁺ descritas con apariencia de células endoteliales, que forman parte de estructuras tubulares (Moldovan *et al.*, 2000). En el interior de los lóbulos hepáticos hay células CD45⁺ pequeñas y redondeadas, y otras grandes de aspecto amorfo, que son además F4/80⁺, lo que sugiere que se trata de macrófagos. De hecho, existen evidencias de fagocitosis de material celular (eritroide) en el interior de estas células. De la misma forma, sería posible que las células tipo macrófago pudieran fagocitar el núcleo de los MKs tras la transformación total del citoplasma en PTs, fenómeno que prácticamente no hemos visualizado *in vivo* a E11.5, aunque no podemos excluir que ocurra posteriormente en la gestación.

Por tanto, se puede concluir que a E11.5 existe una organización de células hematopoyéticas bien definida en los lóbulos hepáticos. Ésta se caracteriza desde la periferia hacia el área central por: a) Una monocapa de células CD45⁺, debajo del mesotelio; b) una banda compuesta de dos a tres capas de células Ter119⁺ y c) una concentración preferencial de MKs unidos a células Tie-2⁺, en general por debajo de la zona de células rojas, que definen el límite del territorio vascular hepático. Esta distribución ordenada en bandas de células presumiblemente maduras (carecen de expresión de c-Kit), concuerda con los resultados recientemente publicados (Chan *et al.*, 2009) en los que se traza la regeneración ósea a partir de células CD105⁺Thy1⁻ aisladas de hueso de E14.5, mediante inyección en la cápsula renal de ratones adultos. Tras una primera etapa de osificación endocondreal, se forma un hueso en cuyo interior pueden observarse focos ectópicos de hematopoyesis por colonización secuencial de células: primero por células vasculares CD31⁺, eritrocitos y células mieloides, seguido por progenitores c-Kit⁺ y finalmente por HSCs. La invasión vascular es también crítica en este proceso, al igual que ocurre en el FL, pues la inhibición de la expresión de VEGF interrumpe el proceso de osificación endocondreal y la posterior hematopoyesis. Por último, existen evidencias de la participación de los MKs en homeostasis esquelética, estimulando tanto la formación como la inhibición de la reabsorción ósea (Kacena *et al.*, 2006).

En resumen, en este trabajo mostramos que los MKs fetales se encuentran selectivamente localizados, y en número elevado, en el FL a E11.5, por lo que, además de los Ery, es uno de los primeros linajes hematopoyéticos en generarse. Nuestros datos, junto con otros previos sobre estas células, apuntan a que, además de participar en procesos de coagulación, los MKs fetales hepáticos y las PTs son elementos implicados en el desarrollo hepático. En concreto, promueven el desarrollo del FL a E11.5, a través de mecanismos de comunicación en los que el contacto célula-célula es esencial. Por otra parte, el estudio de la arquitectura hepática ha revelado la existencia de nichos específicos de linaje en el embrión a E11.5, que ayudan a comprender mejor los procesos de diferenciación hematopoyética y de morfogénesis hepática. Finalmente, estos datos abren la puerta a nuevos estudios sobre la biología celular de los MKs fetales, así como pueden ser herramientas muy útiles en el desarrollo de terapias celulares para el tratamiento de patologías plaquetarias.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La población hepática c-Kit^DCD45⁻Ter119⁻ está formada a E11.5 por progenitores celulares hepato-epiteliales (pHep, CD49f^D) y células del linaje MK (pMK, CD49f^H). Estos últimos, se definen por la expresión de una serie de marcadores de superficie típicos de MKs como son CD41⁺⁺CD9⁺CD42c⁺KDR⁺CD31⁺ y representan un elevado porcentaje del total de células hepáticas.
- 2.- Los pMKs CD49f^Hc-Kit^DCD45⁻CD41⁺⁺ se detectan ya a E10.5 y en diversas localizaciones: YS, P-Sp/AGM, FL y sangre circulante. Los presentes en el FL11.5 tienen un fenotipo más inmaduro, con menor nivel de expresión de CD41 y CD42c y mayor expresión de c-Kit y CD105. Así mismo, tienen una expresión anómala de proteínas endoteliales (NES y KDR) y hepato-epiteliales (ALB, TTR y AFP).
- 3.- Los pMKs de E11.5, a diferencia de los MKs adultos, no expresan CD45 ni CXCR4, mientras que sí presentan integrinas de membrana como CD49b, CD49f, CD29, CD41 y CD61, formando los receptores VLA-2, VLA-4, VLA-5, VLA-6, $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ y CD41/CD61.
- 4.- Las células CD45⁺CD41⁻KDR⁻ purificadas del FL11.5 son capaces de generar MKs *in vitro*, junto con otros tipos celulares (eritroides y mieloides). Las células CD45⁺⁺CD41⁻KDR⁻ producen en cultivo MKs y células mieloides. En su diferenciación hacia MK ambos tipos de progenitores paulatinamente reducen o pierden la expresión de CD45, mientras que adquieren la expresión de marcadores típicos de MKs como son KDR, CD41 y CD42c.
- 5.- Los pMKs hepáticos desarrollan espontáneamente *in vitro* proPTs y microprolongaciones. A las 24 horas del inicio del cultivo, presentan un estadio hasta ahora no descrito, con una morfología fusiforme tipo “gusano” (WL), altamente móvil. A las 48 horas estas células se transforman en células formadoras de proPTs. La TPO, una de las principales citoquinas implicadas en megacariocitopoyesis, no es requerida para esta diferenciación *in vitro*, aunque aumenta el número de células recuperadas así como el tamaño de los MKs, y mejora su adherencia al sustrato. Por el contrario, este proceso (como la formación de células WL) es dependiente de actina-F.
- 6.- Los pMKs hepáticos analizados *in vivo* presentan proPTs y microprolongaciones, y se encuentran asociados al nicho vascular. En concreto, se disponen formando coronas alrededor de los grandes vasos y asociados a pequeños capilares Tie-2⁺. A través de las proPTs emitidas, los MKs establecen un gran número de contactos, preferentemente con progenitores c-Kit⁺ y con pHep (ALB⁺).
- 7.- Los contactos directos célula-célula entre pMKs y pHep son requeridos *in vitro* para la maduración eficiente de los pHep, sugiriendo la implicación de las proPTs como un mecanismo en comunicación celular. La señalización a través de factores solubles produce

también, aunque en menor grado, la maduración de los pHep, siendo el VEGF una de las moléculas implicadas en este fenómeno, y no la serotonina.

- 8.- Las células c-Kit⁺ se localizan dispersas en el FL a E11.5, con predominio en el centro de los lóbulos. A E12.5 la localización predominante es en la periferia, de forma que las células más maduras y diferenciadas se encuentran en el centro del órgano. No hemos evidenciado diferencias en la tasa de proliferación celular entre ambas zonas.
- 9.- A E11.5 se observa una disposición ordenada de subpoblaciones de células maduras en el FL: bajo la cápsula de Glisson, las células CD45⁺ y las células Ery aparecen en monocapas, delimitando una zona de capilares con MKs asociados. De los grandes vasos del parénquima hepático central parten cordones radiales de células Ery (que ya a E11.5 forman islotes eritroblásticos), entre las que se disponen isletas de células pHep ALB⁺ en cuyo interior existen células c-Kit⁺.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M y Jacobsen SE** (2005). Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121:295-306.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T y Weissman IL** (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404:193-197.
- Almeida-Porada G y Ascensao JL** (1996). Isolation, characterization, and biologic features of bone marrow endothelial cells. *J Lab Clin Med*, 128:399-407.
- Alvarez-Silva M, Belo-Diabangouaya P, Salaun J y Dieterlen-Lievre F** (2003). Mouse placenta is a major hematopoietic organ. *Development*, 130:5437-5444.
- Allman D, Aster JC y Pear WS** (2002). Notch signaling in hematopoiesis and early lymphocyte development. *Immunol Rev*, 187:75-86.
- Anderson KL, Nelson SL, Perkin HB, Smith KA, Klemsz MJ y Torbett BE** (2001). PU.1 is a lineage-specific regulator of tyrosine phosphatase CD45. *J Biol Chem*, 276:7637-7642.
- Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K y Nagasawa T** (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*, 19:257-267.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY y Suda T** (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118:149-161.
- Arcasoy MO** (2008). The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol*, 141:14-31.
- Arinobu Y, Iwasaki H y Akashi K** (2009). Origin of basophils and mast cells. *Allergol Int*, 58:21-28.
- Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, Shigematsu H, Iino T, Iwasaki H, Graf T, Mayfield R, Chan S, Kastner P y Akashi K** (2007). Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. *Cell Stem Cell*, 1:416-427.
- Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, Kumashiro Y, Okamura K, Tanaka Y, Teramoto K, Arai S y Teraoka H** (2004). Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. *Genes Cells*, 9:1297-1308.
- Auer KL, Contessa J, Brenz-Verca S, Pirola L, Rusconi S, Cooper G, Abo A, Wymann MP, Davis RJ, Birrer M y Dent P** (1998). The Ras/Rac1/Cdc42/SEK/JNK/c-Jun cascade is a key pathway by which agonists stimulate DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 9:561-573.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, Jin DK, Dias S, Zhang F, Hartman TE, Hackett NR, Crystal RG, Witte L, Hicklin DJ, Bohlen P, Eaton D, Lyden D, de Sauvage F y Rafii S** (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, 10:64-71.

- Baatout S** (1998). Megakaryocytopoiesis: growth factors, cell cycle and gene expression. *Anticancer Res*, 18:1871-1882.
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reca R, Janowska-Wieczorek A y Ratajczak MZ** (2002). Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 30:450-459.
- Baron M** (2001). Induction of embryonic hematopoietic and endothelial stem/progenitor cells by hedgehog-mediated signals. *Differentiation*, 68:175-185.
- Baumann CI, Bailey AS, Li W, Ferkowicz MJ, Yoder MC y Fleming WH** (2004). PECAM-1 is expressed on hematopoietic stem cells throughout ontogeny and identifies a population of erythroid progenitors. *Blood*, 104:1010-1016.
- Becker RP y De Bruyn PP** (1976). The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*, 145:183-205.
- Behnke O** (1968). An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow. I. The development of the demarcation membrane system and the platelet surface coat. *J Ultrastruct Res*, 24:412-433.
- Berlanga O, Bobe R, Becker M, Murphy G, Leduc M, Bon C, Barry FA, Gibbins JM, Garcia P, Frampton J y Watson SP** (2000). Expression of the collagen receptor glycoprotein VI during megakaryocyte differentiation. *Blood*, 96:2740-2745.
- Bertrand JY, Giroux S, Golub R, Klaine M, Jalil A, Boucontet L, Godin I y Cumano A** (2005). Characterization of purified intraembryonic hematopoietic stem cells as a tool to define their site of origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:134-139.
- Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A y Birchmeier C** (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature*, 376:768-771.
- Bobik R, Hong Y, Breier G, Martin JF y Erusalimsky JD** (1998). Thrombopoietin stimulates VEGF release from c-Mpl-expressing cell lines and haematopoietic progenitors. *FEBS Lett*, 423:10-14.
- Bornstein R, Garcia-Vela J, Gilsanz F, Auray C y Cales C** (2001). Cord blood megakaryocytes do not complete maturation, as indicated by impaired establishment of endomitosis and low expression of G1/S cyclins upon thrombopoietin-induced differentiation. *Br J Haematol*, 114:458-465.
- Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP y Zaret KS** (2006). Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol*, 290:44-56.
- Brill S, Holst P, Sigal S, Zvibel I, Fiorino A, Ochs A, Somasundaran U y Reid LM** (1993). Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver. *Proc Soc Exp Biol Med*, 204:261-269.
- Burda P, Curik N, Kokavec J, Basova P, Mikulenkova D, Skoultchi AI, Zavadil J y Stopka T** (2009). PU.1 activation relieves GATA-1-mediated repression of Cebpa and Cbfb during leukemia differentiation. *Mol Cancer Res*, 7:1693-1703.

- Butler TM, Ziemiecki A y Friis RR** (1990). Megakaryocytic differentiation of K562 cells is associated with changes in the cytoskeletal organization and the pattern of chromatographically distinct forms of phosphotyrosyl-specific protein phosphatases. *Cancer Res*, 50:6323-6329.
- Buza-Vidas N, Antonchuk J, Qian H, Mansson R, Luc S, Zandi S, Anderson K, Takaki S, Nygren JM, Jensen CT y Jacobsen SE** (2006). Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev*, 20:2018-2023.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM y Scadden DT** (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425:841-846.
- Carramolino L, Fuentes J, Garcia-Andres C, Azcoitia V, Riethmacher D y Torres M** (2010). Platelets play an essential role in separating the blood and lymphatic vasculatures during embryonic angiogenesis. *Circ Res*, 106:1197-1201.
- Casella I, Feccia T, Chelucci C, Samoggia P, Castelli G, Guerriero R, Parolini I, Petrucci E, Pelosi E, Morsilli O, Gabbianelli M, Testa U y Peschle C** (2003). Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood*, 101:1316-1323.
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M y Zaret KS** (2002). Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell*, 9:279-289.
- Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML y Graf R** (2007). Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*, 356:1545-1559.
- Clyman R y Chemtob S** (2010). Vessel remodeling in the newborn: platelets fill the gap. *Nat Med*, 16:33-35.
- Corbel C, Vaigot P y Salaun J** (2005). (alpha)IIb Integrin, a novel marker for hemopoietic progenitor cells. *Int J Dev Biol*, 49:279-284.
- Cote F, Fligny C, Bayard E, Launay JM, Gershon MD, Mallet J y Vodjdani G** (2007). Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:329-334.
- Coulombel L** (2004). Identification of hematopoietic stem/progenitor cells: strength and drawbacks of functional assays. *Oncogene*, 23:7210-7222.
- Couvelard A, Bringuier AF, Dauge MC, Nejjar M, Darai E, Benifla JL, Feldmann G, Henin D y Scoazec JY** (1998). Expression of integrins during liver organogenesis in humans. *Hepatology*, 27:839-847.
- Cumano A y Godin I** (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*, 25:745-785.
- Chan CK, Chen CC, Luppen CA, Kim JB, DeBoer AT, Wei K, Helms JA, Kuo CJ, Kraft DL y Weissman IL** (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature*, 457:490-494.
- Chang AN, Cantor AB, Fujiwara Y, Lodish MB, Droho S, Crispino JD y Orkin SH** (2002). GATA-factor dependence of the multitype zinc-finger protein FOG-1 for its essential role in megakaryopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99:9237-9242.
- Chang Y, Bluteau D, Debili N y Vainchenker W** (2007). From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1:318-327.

- Chen Z, Hu M y Shivdasani RA** (2007). Expression analysis of primary mouse megakaryocyte differentiation and its application in identifying stage-specific molecular markers and a novel transcriptional target of NF-E2. *Blood*, 109:1451-1459.
- Choi ES, Hokom MM, Chen JL, Skrine J, Faust J, Nichol J y Hunt P** (1996). The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Haematol*, 95:227-233.
- Choi ES, Nichol JL, Hokom MM, Hornkohl AC y Hunt P** (1995). Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional. *Blood*, 85:402-413.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC y Keller G** (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development*, 125:725-732.
- Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Kingsley PD, Palis J y Choi K** (2002). Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development*, 129:5511-5520.
- D'Souza SL, Elefanty AG y Keller G** (2005). SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood*, 105:3862-3870.
- Dame C, Kirschner KM, Bartz KV, Wallach T, Hussels CS y Scholz H** (2006). Wilms tumor suppressor, Wt1, is a transcriptional activator of the erythropoietin gene. *Blood*, 107:4282-4290.
- Dar A, Goichberg P, Shinder V, Kalinkovich A, Kollet O, Netzer N, Margalit R, Zsak M, Nagler A, Hardan I, Resnick I, Rot A y Lapidot T** (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol*, 6:1038-1046.
- de Alarcon PA y Graeve JL** (1996). Analysis of megakaryocyte ploidy in fetal bone marrow biopsies using a new adaptation of the feulgen technique to measure DNA content and estimate megakaryocyte ploidy from biopsy specimens. *Pediatr Res*, 39:166-170.
- de Bruijn MF, Speck NA, Peeters MC y Dzierzak E** (2000). Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *Embo J*, 19:2465-2474.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ, Oles KJ, Hutgren B, Solberg LA, Goeddel JR y Eaton DL** (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*, 369:533-538.
- Debili N, Louache F y Vainchenker W** (2004). Isolation and culture of megakaryocyte precursors. *Methods Mol Biol*, 272:293-308.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J y Zaret KS** (2001). A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*, 128:871-881.
- Douarin NM** (1975). An experimental analysis of liver development. *Med Biol*, 53:427-455.
- Duncan SA** (2000). Transcriptional regulation of liver development. *Dev Dyn*, 219:131-142.
- Dunois-Lardé C, Capron C, Fichelson S, Bauer T, Cramer-Bordé E y Baruch D** (2009). Exposure of human megakaryocytes to high shear rates accelerates platelet-production. *Blood*, 114:1875-1883.
- Dyer MA, Farrington SM, Mohn D, Munday JR y Baron MH** (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, 128:1717-1730.

- Dzierzak E, Medvinsky A y de Bruijn M** (1998). Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. *Immunol Today*, 19:228-236.
- Echtler K, Stark K, Lorenz M, Kerstan S, Walch A, Jennen L, Rudelius M, Seidl S, Kremmer E, Emambokus NR, von Bruehl ML, Frampton J, Isermann B, Genzel-Boroviczeny O, Schreiber C, Mehilli J, Kastrati A, Schwaiger M, Shivdasani RA y Massberg S** (2010). Platelets contribute to postnatal occlusion of the ductus arteriosus. *Nat Med*, 16:75-82.
- Eisbacher M, Khachigian LM, Khin TH, Holmes ML y Chong BH** (2001). Inducible expression of the megakaryocyte-specific gene glycoprotein IX is mediated through an Ets binding site and involves upstream activation of extracellular signal-regulated kinase. *Cell Growth Differ*, 12:435-445.
- Ema H, Morita Y, Nakauchi H y Matsuzaki Y** (2005). Isolation of murine hematopoietic stem cells and progenitor cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 22:Unit 22B 21.
- Ferkowicz MJ, Starr M, Xie X, Li W, Johnson SA, Shelley WC, Morrison PR y Yoder MC** (2003). CD41 expression defines the onset of primitive and definitive hematopoiesis in the murine embryo. *Development*, 130:4393-4403.
- Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K y de Sauvage FJ** (1996). Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood*, 87:2154-2161.
- Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M y Italiano JE, Jr.** (2009). Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*, 113:1112-1121.
- Forsberg EC, Serwold T, Kogan S, Weissman IL y Passegue E** (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3⁺ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell*, 126:415-426.
- Fraser ST, Ogawa M, Yu RT, Nishikawa S, Yoder MC y Nishikawa S** (2002). Definitive hematopoietic commitment within the embryonic vascular endothelial-cadherin⁽⁺⁾ population. *Exp Hematol*, 30:1070-1078.
- Frontelo P, Manwani D, Galdass M, Karsunky H, Lohmann F, Gallagher PG y Bieker JJ** (2007). Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. *Blood*, 110:3871-3880.
- Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H y Fujimura K** (2003). Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood*, 102:4044-4051.
- Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER y Thorgeirsson SS** (1994). Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest*, 70:511-516.
- Fukuda-Taira S** (1981). Hepatic induction in the avian embryo: specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol*, 63:111-125.
- Furuta Y, Piston DW y Hogan BL** (1997). Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development*, 124:2203-2212.
- Gaspar ML, Meo T y Tosi M** (1990). Structure and size distribution of the androgen receptor mRNA in wild-type and Tfm/Y mutant mice. *Mol Endocrinol*, 4:1600-1610.

- Gekas C, Dieterlen-Lievre F, Orkin SH y Mikkola HK** (2005). The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. *Dev Cell*, 8:365-375.
- Georges-Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A y Le Meur M** (1996). Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat Genet*, 13:370-373.
- Ghatpande S, Ghatpande A, Sher J, Zile MH y Evans T** (2002). Retinoid signaling regulates primitive (yolk sac) hematopoiesis. *Blood*, 99:2379-2386.
- Giroux S y Charron J** (1998). Defective development of the embryonic liver in N-myc-deficient mice. *Dev Biol*, 195:16-28.
- Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lievre F y Marcos MA** (1993). Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature*, 364:67-70.
- Gordon S, Crocker PR, Morris L, Lee SH, Perry VH y Hume DA** (1986). Localization and function of tissue macrophages. *Ciba Found Symp*, 118:54-67.
- Gralnick HR, Williams S, McKeown LP, Hansmann K, Fenton JW, 2nd y Krutzsch H** (1994). High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: identification of two binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:6334-6338.
- Greenberg JM, Thompson FY, Brooks SK, Shannon JM, McCormick-Shannon K, Cameron JE, Mallory BP y Akeson AL** (2002). Mesenchymal expression of vascular endothelial growth factors D and A defines vascular patterning in developing lung. *Dev Dyn*, 224:144-153.
- Grisham J, Thorgeirsson SS.** (1997). Liver stem cells. Potten CS eds. *Stem Cells*. Academic London, 233-282.
- Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB y Watzek G** (2004). Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*, 15:29-35.
- Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR y Zaret KS** (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev*, 10:1670-1682.
- Guo Y, Niu C, Breslin P, Tang M, Zhang S, Wei W, Kini AR, Paner GP, Alkan S, Morris SW, Diaz M, Stiff PJ y Zhang J** (2009). c-Myc-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Blood*, 114:2097-2106.
- Gurney AL, Carver-Moore K, de Sauvage FJ y Moore MW** (1994). Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science*, 265:1445-1447.
- Gurney AL y de Sauvage FJ** (1996). Dissection of c-Mpl and thrombopoietin function: studies of knockout mice and receptor signal transduction. *Stem Cells*, 14 Suppl 1:116-123.
- Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, Levin J y Bainton DF** (1990). Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest*, 86:1364-1368.
- Handagama PJ, Shuman MA y Bainton DF** (1989). Incorporation of intravenously injected albumin, immunoglobulin G, and fibrinogen in guinea pig megakaryocyte granules. *J Clin Invest*, 84:73-82.
- Harker LA y Finch CA** (1969). Thrombokinetiks in man. *J Clin Invest*, 48:963-974.

- Hart A, Melet F, Grossfeld P, Chien K, Jones C, Tunnacliffe A, Favier R y Bernstein A** (2000). Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity*, 13:167-177.
- Hartwig JH y Italiano JE, Jr.** (2006). Cytoskeletal mechanisms for platelet production. *Blood Cells Mol Dis*, 36:99-103.
- He C, Hu H, Braren R, Fong SY, Trumpp A, Carlson TR y Wang RA** (2008). c-myc in the hematopoietic lineage is crucial for its angiogenic function in the mouse embryo. *Development*, 135:2467-2477.
- Heller PG, Glembotsky AC, Gandhi MJ, Cummings CL, Pirola CJ, Marta RF, Kornblihtt LI, Drachman JG y Molinas FC** (2005). Low Mpl receptor expression in a pedigree with familial platelet disorder with predisposition to acute myelogenous leukemia and a novel AML1 mutation. *Blood*, 105:4664-4670.
- Hermiston ML, Xu Z y Weiss A** (2003). CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21:107-137.
- Hilberg F, Aguzzi A, Howells N y Wagner EF** (1993). c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis. *Nature*, 365:179-181.
- Hill RJ, Warren MK, Stenberg P, Levin J, Corash L, Drummond R, Baker G, Levin F y Mok Y** (1991). Stimulation of megakaryocytopoiesis in mice by human recombinant interleukin-6. *Blood*, 77:42-48.
- Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, Rayburn H, Crowley D, Ullman-Cullere M, Ross FP, Collier BS, Teitelbaum S y Hynes RO** (1999). Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest*, 103:229-238.
- Houssaint E** (1981). Differentiation of the mouse hepatic primordium. II. Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. *Cell Differ*, 10:243-252.
- Huang H y Cantor AB** (2009). Common features of megakaryocytes and hematopoietic stem cells: what's the connection? *J Cell Biochem*, 107:857-864.
- Hunt P, Hokom MM, Wiemann B, Leven RM y Arakawa T** (1993). Megakaryocyte proplatelet-like process formation in vitro is inhibited by serum prothrombin, a process which is blocked by matrix-bound glycosaminoglycans. *Exp Hematol*, 21:372-381.
- Hynes RO** (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69:11-25.
- Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, Mitani K, Chiba S, Ogawa S, Kurokawa M y Hirai H** (2004). AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat Med*, 10:299-304.
- Ijpenberg A, Perez-Pomares JM, Guadix JA, Carmona R, Portillo-Sanchez V, Macias D, Hohenstein P, Miles CM, Hastie ND y Munoz-Chapuli R** (2007). Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol*, 312:157-170.
- Isern J, Fraser ST, He Z y Baron MH** (2008). The fetal liver is a niche for maturation of primitive erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:6662-6667.
- Italiano JE, Jr., Lecine P, Shivdasani RA y Hartwig JH** (1999). Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol*, 147:1299-1312.

- Italiano JE, Jr., Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, Ryeom S, Folkman J y Klement GL** (2008). Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released. *Blood*, 111:1227-1233.
- Jaffredo T, Nottingham W, Liddiard K, Bollerot K, Pouget C y de Bruijn M** (2005). From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection? *Exp Hematol*, 33:1029-1040.
- Janowska-Wieczorek A, Majka M, Kijowski J, Baj-Krzyworzeka M, Reza R, Turner AR, Ratajczak J, Emerson SG, Kowalska MA y Ratajczak MZ** (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 98:3143-3149.
- Jones CM, Lyons KM y Hogan BL** (1991). Involvement of Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) and Vgr-1 in morphogenesis and neurogenesis in the mouse. *Development*, 111:531-542.
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M y Zaret KS** (1999). Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science*, 284:1998-2003.
- Junt T, Schulze H, Chen Z, Massberg S, Goerge T, Krueger A, Wagner DD, Graf T, Italiano JE, Jr., Shivdasani RA y von Andrian UH** (2007). Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 317:1767-1770.
- Kabaya K, Akahori H, Shibuya K, Nitta Y, Ida M, Kusaka M, Kato T y Miyazaki H** (1996). In vivo effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on hematopoiesis in normal mice. *Stem Cells*, 14:651-660.
- Kacena MA, Gundberg CM y Horowitz MC** (2006). A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone*, 39:978-984.
- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T y Miyajima A** (1999). Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *Embo J*, 18:2127-2136.
- Kamiya A, Kinoshita T y Miyajima A** (2001). Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett*, 492:90-94.
- Kapur R y Zhang L** (2001). A novel mechanism of cooperation between c-Kit and erythropoietin receptor. Stem cell factor induces the expression of Stat5 and erythropoietin receptor, resulting in efficient proliferation and survival by erythropoietin. *J Biol Chem*, 276:1099-1106.
- Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A y Satow Y** (1995). Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, 55:5687-5692.
- Kaushansky K** (2003). Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis. *J Thromb Haemost*, 1:1587-1592.
- Kennedy M, Firpo M, Choi K, Wall C, Robertson S, Kabrun N y Keller G** (1997). A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature*, 386:488-493.
- Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W y Breton-Gorius J** (1987). Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem*, 164:189-195.

- Kiel MJ, Iwashita T, Yilmaz OH y Morrison SJ** (2005a). Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol*, 283:29-39.
- Kiel MJ y Morrison SJ** (2006). Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity*, 25:862-864.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C y Morrison SJ** (2005b). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121:1109-1121.
- Kikuchi J, Furukawa Y, Iwase S, Terui Y, Nakamura M, Kitagawa S, Kitagawa M, Komatsu N y Miura Y** (1997). Polyploidization and functional maturation are two distinct processes during megakaryocytic differentiation: involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in polyploidization. *Blood*, 89:3980-3990.
- Kim HK, Song KS, Chung JH, Lee KR y Lee SN** (2004). Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*, 124:376-384.
- Kim I, Yilmaz OH y Morrison SJ** (2005). CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells. *Blood*, 106:903-905.
- Kinoshita T, Sekiguchi T, Xu MJ, Ito Y, Kamiya A, Tsuji K, Nakahata T y Miyajima A** (1999). Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96:7265-7270.
- Kinoshita T, Tashiro K y Nakamura T** (1989). Marked increase of HGF mRNA in non-parenchymal liver cells of rats treated with hepatotoxins. *Biochem Biophys Res Commun*, 165:1229-1234.
- Klinger MH** (1997). Platelets and inflammation. *Anat Embryol (Berl)*, 196:1-11.
- Kondo M, Weissman IL y Akashi K** (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91:661-672.
- Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Shmelkov SV, Ramos CA, Zhang F y Rafii S** (2005). Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. *Blood*, 106:505-513.
- Kumano K, Chiba S, Kunisato A, Sata M, Saito T, Nakagami-Yamaguchi E, Yamaguchi T, Masuda S, Shimizu K, Takahashi T, Ogawa S, Hamada Y y Hirai H** (2003). Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity*, 18:699-711.
- Kumar M, Jordan N, Melton D y Grapin-Botton A** (2003). Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol*, 259:109-122.
- Laguerre-Lak-Hal AH, Debili N, Kingbury G, Lecut C, Le Couedic JP, Villeval JL, Jandrot-Perrus M y Vainchenker W** (2001). Expression and function of the collagen receptor GPVI during megakaryocyte maturation. *J Biol Chem*, 276:15316-15325.
- Lai AY y Kondo M** (2006). Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*, 203:1867-1873.

- Lane WJ, Dias S, Hattori K, Heissig B, Choy M, Rabbany SY, Wood J, Moore MA y Rafii S** (2000). Stromal-derived factor 1-induced megakaryocyte migration and platelet production is dependent on matrix metalloproteinases. *Blood*, 96:4152-4159.
- Le Douarin N** (1963). Role of mesenchyme in hepatic histogenesis in the chick embryo. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 257:255-257.
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ y Ferrara N** (2003). Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*, 299:890-893.
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M y Clavien PA** (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, 312:104-107.
- Levin J, Peng JP, Baker GR, Villeval JL, Lecine P, Burstein SA y Shivdasani RA** (1999). Pathophysiology of thrombocytopenia and anemia in mice lacking transcription factor NF-E2. *Blood*, 94:3037-3047.
- Levine RF, Olson TA, Shoff PK, Miller MK y Weisman LE** (1996). Mature micromegakaryocytes: an unusual developmental pattern in term infants. *Br J Haematol*, 94:391-399.
- Lewis JC, Maldonado JE y Mann KG** (1976). Phagocytosis in human platelets: localization of acid phosphatase-positive phagosomes following latex uptake. *Blood*, 47:833-840.
- Li W, Johnson SA, Shelley WC, Ferkowicz M, Morrison P, Li Y y Yoder MC** (2003). Primary endothelial cells isolated from the yolk sac and para-aortic splanchnopleura support the expansion of adult marrow stem cells in vitro. *Blood*, 102:4345-4353.
- Lian G, Wang C, Teng C, Zhang C, Du L, Zhong Q, Miao C, Ding M y Deng H** (2006). Failure of hepatocyte marker-expressing hematopoietic progenitor cells to efficiently convert into hepatocytes in vitro. *Exp Hematol*, 34:348-358.
- Liao WS, Conn AR y Taylor JM** (1980). Changes in rat alpha 1-fetoprotein and albumin mRNA levels during fetal and neonatal development. *J Biol Chem*, 255:10036-10039.
- Liu YS y Yang M** (2006). The effect of 5-hydroxytryptamine on the regulation of megakaryocytopoiesis. *Hematology*, 11:53-56.
- Ma DC, Sun YH, Zuo W, Chang KZ, Chu JJ y Liu YG** (2000). CD34+ cells derived from fetal liver contained a high proportion of immature megakaryocytic progenitor cells. *Eur J Haematol*, 64:304-314.
- Mansson R, Hultquist A, Luc S, Yang L, Anderson K, Kharazi S, Al-Hashmi S, Liuba K, Thoren L, Adolfsson J, Buza-Vidas N, Qian H, Soneji S, Enver T, Sigvardsson M y Jacobsen SE** (2007). Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*, 26:407-419.
- Marciniak-Czochra A, Stiehl T, Ho AD, Jager W y Wagner W** (2009). Modeling of asymmetric cell division in hematopoietic stem cells--regulation of self-renewal is essential for efficient repopulation. *Stem Cells Dev*, 18:377-385.
- Matsubara A, Iwama A, Yamazaki S, Furuta C, Hirasawa R, Morita Y, Osawa M, Motohashi T, Eto K, Ema H, Kitamura T, Vestweber D y Nakauchi H** (2005). Endomucin, a CD34-like sialomucin, marks hematopoietic stem cells throughout development. *J Exp Med*, 202:1483-1492.

- Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, Miyazaki J, Aburatani H, Nakauchi H y Ema H** (2009). Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PLoS One*, 4:e4820.
- Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J y Zaret KS** (2001). Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science*, 294:559-563.
- Matsumura-Takeda K, Sogo S, Isakari Y, Harada Y, Nishioka K, Kawakami T, Ono T y Taki T** (2007). CD41⁺/CD45⁺ cells without acetylcholinesterase activity are immature and a major megakaryocytic population in murine bone marrow. *Stem Cells*, 25:862-870.
- Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kubota T, Narimatsu H y Ozaki M** (2008). Platelets Strongly Induce Hepatocyte Proliferation with IGF-1 and HGF In Vitro. *J Surg Res*, 145:279-286.
- Mazharian A, Watson SP y Severin S** (2009). Critical role for ERK1/2 in bone marrow and fetal liver-derived primary megakaryocyte differentiation, motility, and proplatelet formation. *Exp Hematol*, 37:1238-1249 e1235.
- McGrath KE y Palis J** (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol*, 33:1021-1028.
- Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y y Orkin SH** (2003). Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. *Nature*, 421:547-551.
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martinez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML y Marcos MA** (2003). A population of c-Kit^(low)(CD45/TER119)⁻ hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest*, 112:1152-1163.
- Miyazaki H** (1996). Physiologic role of TPO in thrombopoiesis. *Stem Cells*, 14:133-138.
- Mohle R, Green D, Moore MA, Nachman RL y Rafii S** (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:663-668.
- Moldovan NI, Goldschmidt-Clermont PJ, Parker-Thornburg J, Shapiro SD y Kolattukudy PE** (2000). Contribution of monocytes/macrophages to compensatory neovascularization: the drilling of metalloelastase-positive tunnels in ischemic myocardium. *Circ Res*, 87:378-384.
- Morley J, Sanjar S y Page CP** (1984). The platelet in asthma. *Lancet*, 2:1142-1144.
- Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A y Hoshi R** (2007). Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg*, 31:808-816.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H y Kishimoto T** (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382:635-638.
- Nakamura M, Shibasaki M, Nitta Y y Endo Y** (1998). Translocation of platelets into Disse spaces and their entry into hepatocytes in response to lipopolysaccharides, interleukin-1 and tumour necrosis factor: the role of Kupffer cells. *J Hepatol*, 28:991-999.

- Nakorn TN, Miyamoto T y Weissman IL** (2003). Characterization of mouse clonogenic megakaryocyte progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:205-210.
- Netelenbos T, van den Born J, Kessler FL, Zweegman S, Merle PA, van Oostveen JW, Zwaginga JJ, Huijgens PC y Drager AM** (2003). Proteoglycans on bone marrow endothelial cells bind and present SDF-1 towards hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*, 17:175-184.
- Netelenbos T, Zijderduijn S, Van Den Born J, Kessler FL, Zweegman S, Huijgens PC y Drager AM** (2002). Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol*, 72:353-362.
- North TE, Stacy T, Matheny CJ, Speck NA y de Bruijn MF** (2004). Runx1 is expressed in adult mouse hematopoietic stem cells and differentiating myeloid and lymphoid cells, but not in maturing erythroid cells. *Stem Cells*, 22:158-168.
- Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Dingemans KP, Vermeulen JL, van den Eijnde S, Reutelingsperger CP, Hut H, Willemsen R, Offerhaus GJ y Lamers WH** (2003). Timing and sequence of differentiation of embryonic rat hepatocytes along the biliary epithelial lineage. *Hepatology*, 38:683-691.
- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G y Downing JR** (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, 84:321-330.
- Orkin SH, Shivdasani RA, Fujiwara Y y McDevitt MA** (1998). Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells*, 16 Suppl 2:79-83.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C y Keller G** (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*, 126:5073-5084.
- Palis J y Yoder MC** (2001). Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*, 29:927-936.
- Palumbo JS, Zogg M, Talmage KE, Degen JL, Weiler H y Isermann BH** (2004). Role of fibrinogen- and platelet-mediated hemostasis in mouse embryogenesis and reproduction. *J Thromb Haemost*, 2:1368-1379.
- Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, Engel JD y Lindenbaum MH** (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat Genet*, 11:40-44.
- Pang L, Weiss MJ y Poncz M** (2005). Megakaryocyte biology and related disorders. *J Clin Invest*, 115:3332-3338.
- Patel-Hett S, Richardson JL, Schulze H, Drabek K, Isaac NA, Hoffmeister K, Shivdasani RA, Bulinski JC, Galjart N, Hartwig JH y Italiano JE, Jr.** (2008). Visualization of microtubule growth in living platelets reveals a dynamic marginal band with multiple microtubules. *Blood*, 111:4605-4616.
- Patel SR, Hartwig JH y Italiano JE, Jr.** (2005). The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*, 115:3348-3354.

- Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Macias D, Guadix JA y Munoz-Chapuli R** (2004). Contribution of mesothelium-derived cells to liver sinusoids in avian embryos. *Dev Dyn*, 229:465-474.
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV y Fitzgerald LA** (1988). The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*, 71:831-843.
- Pilcher KE y Krieg PA** (2002). Expression of the Wnt inhibitor, sFRP5, in the gut endoderm of *Xenopus*. *Gene Expr Patterns*, 2:369-372.
- Qian H, Georges-Labouesse E, Nystrom A, Domogatskaya A, Tryggvason K, Jacobsen SE y Ekblom M** (2007). Distinct roles of integrins alpha6 and alpha4 in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 110:2399-2407.
- Radley JM y Haller CJ** (1982). The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood*, 60:213-219.
- Radley JM, Hartshorn MA y Green SL** (1987). The response of megakaryocytes with processes to thrombin. *Thromb Haemost*, 58:732-736.
- Rhodes KE, Gekas C, Wang Y, Lux CT, Francis CS, Chan DN, Conway S, Orkin SH, Yoder MC y Mikkola HK** (2008). The emergence of hematopoietic stem cells is initiated in the placental vasculature in the absence of circulation. *Cell Stem Cell*, 2:252-263.
- Riviere C, Subra F, Cohen-Solal K, Cordette-Lagarde V, Letestu R, Auclair C, Vainchenker W y Louache F** (1999). Phenotypic and functional evidence for the expression of CXCR4 receptor during megakaryocytopoiesis. *Blood*, 93:1511-1523.
- Robert-Moreno A, Espinosa L, de la Pompa JL y Bigas A** (2005). RBPjkappa-dependent Notch function regulates Gata2 and is essential for the formation of intra-embryonic hematopoietic cells. *Development*, 132:1117-1126.
- Rodrigues GA, Park M y Schlessinger J** (1997). Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *Embo J*, 16:2634-2645.
- Rojnuckarin P y Kaushansky K** (2001). Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood*, 97:154-161.
- Rothrock R, Lee KL, Isham KR, Johnson AC y Kenney FT** (1987). Different mechanisms control developmental activation of transcription of genes subject to identical hormonal regulation in adult liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 144:1182-1187.
- Sabin FR** (2002). Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *J Hematother Stem Cell Res*, 11:5-7.
- Sadlon TJ, Lewis ID y D'Andrea RJ** (2004). BMP4: its role in development of the hematopoietic system and potential as a hematopoietic growth factor. *Stem Cells*, 22:457-474.
- Sanchez A, Alvarez AM, Benito M y Fabregat I** (1995). Transforming growth factor beta modulates growth and differentiation of fetal hepatocytes in primary culture. *J Cell Physiol*, 165:398-405.
- Sasaki K y Iwatsuki H** (1997). Origin and fate of the central macrophages of erythroblastic islands in the fetal and neonatal mouse liver. *Microsc Res Tech*, 39:398-405.

- Sasaki K, Iwatsuki H, Suda M y Itano C** (1993). Scavenger macrophages and central macrophages of erythroblastic islands in liver hemopoiesis of the fetal and early postnatal mouse: a semithin light- and electron-microscopic study. *Acta Anat (Basel)*, 147:75-82.
- Scott EW, Simon MC, Anastasi J y Singh H** (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265:1573-1577.
- Schmelzer E, Deiwick A, Bruns H, Fiegel HC y Bader A** (2008). Thrombopoietin is a growth factor for rat hepatic progenitors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20:209-216.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschesche W, Sharpe M, Gherardi E y Birchmeier C** (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 373:699-702.
- Schulze H, Korpai M, Hurov J, Kim SW, Zhang J, Cantley LC, Graf T y Shivdasani RA** (2006). Characterization of the megakaryocyte demarcation membrane system and its role in thrombopoiesis. *Blood*, 107:3868-3875.
- Schweitzer KM, Drager AM, van der Valk P, Thijsen SF, Zevenbergen A, Theijssmeijer AP, van der Schoot CE y Langenhuijsen MM** (1996). Constitutive expression of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 on endothelial cells of hematopoietic tissues. *Am J Pathol*, 148:165-175.
- Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Jr., Hartwig JH y Shivdasani RA** (2001). A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol*, 11:579-586.
- Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM y Deutsch GH** (2005). Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development*, 132:35-47.
- Shackney SE, Ford SS y Wittig AB** (1975). Kinetic-microarchitectural correlations in the bone marrow of the mouse. *Cell Tissue Kinet*, 8:505-516.
- Shah VO, Civin CI y Loken MR** (1988). Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol*, 140:1861-1867.
- Shaklai M y Tavassoli M** (1978). Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res*, 62:270-285.
- Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A y Rossant J** (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*, 89:981-990.
- Shiojiri N, Lemire JM y Fausto N** (1991). Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res*, 51:2611-2620.
- Shirota T y Tavassoli M** (1991). Cyclophosphamide-induced alterations of bone marrow endothelium: implications in homing of marrow cells after transplantation. *Exp Hematol*, 19:369-373.
- Shivdasani RA, Mayer EL y Orkin SH** (1995a). Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature*, 373:432-434.
- Shivdasani RA y Orkin SH** (1995). Erythropoiesis and globin gene expression in mice lacking the transcription factor NF-E2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:8690-8694.
- Shivdasani RA y Orkin SH** (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*, 87:4025-4039.

- Shivdasani RA, Rosenblatt MF, Zucker-Franklin D, Jackson CW, Hunt P, Saris CJ y Orkin SH (1995b).** Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 81:695-704.
- Siler U, Rousselle P, Muller CA y Klein G (2002).** Laminin gamma2 chain as a stromal cell marker of the human bone marrow microenvironment. *Br J Haematol*, 119:212-220.
- Song WJ, Sullivan MG, Legare RD, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende IC, Haworth C, Hock R, Loh M, Felix C, Roy DC, Busque L, Kurnit D, Willman C, Gewirtz AM, Speck NA, Bushweller JH, Li FP, Gardiner K, Poncz M, Maris JM y Gilliland DG (1999).** Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet*, 23:166-175.
- Sosa-Pineda B, Wigle JT y Oliver G (2000).** Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nat Genet*, 25:254-255.
- Sugiyama Y, Takabe Y, Nakakura T, Tanaka S, Koike T y Shiojiri N (2009).** Sinusoid development and morphogenesis may be stimulated by VEGF-Flk-1 signaling during fetal mouse liver development. *Dev Dyn*, 239:386-397.
- Suksaweang S, Lin CM, Jiang TX, Hughes MW, Widelitz RB y Chuong CM (2004).** Morphogenesis of chicken liver: identification of localized growth zones and the role of beta-catenin/Wnt in size regulation. *Dev Biol*, 266:109-122.
- Sun W y Downing JR (2004).** Haploinsufficiency of AML1 results in a decrease in the number of LTR-HSCs while simultaneously inducing an increase in more mature progenitors. *Blood*, 104:3565-3572.
- Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H y Taniguchi H (2000).** Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology*, 32:1230-1239.
- Takeuchi M, Sekiguchi T, Hara T, Kinoshita T y Miyajima A (2002).** Cultivation of aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic stem cells in the fetal liver microenvironment amplifies long-term repopulating activity and enhances engraftment to the bone marrow. *Blood*, 99:1190-1196.
- Taniguchi E, Sakisaka S, Matsuo K, Tanikawa K y Sata M (2001).** Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem*, 49:121-130.
- Tavassoli M (1992).** Hemopoietic endothelium, incognito. *Exp Hematol*, 20:386-387.
- Till JE y Mc CE (1961).** A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14:213-222.
- Tober J, Koniski A, McGrath KE, Vemishetti R, Emerson R, de Mesy-Bentley KK, Waugh R y Palis J (2007).** The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*, 109:1433-1441.
- Tober J, McGrath KE y Palis J (2008).** Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myb. *Blood*, 111:2636-2639.

- Tomer A** (2004). Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood*, 104:2722-2727.
- Tremblay KD y Zaret KS** (2005). Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol*, 280:87-99.
- Trowbridge EA, Martin JF, Slater DN, Kishk YT, Warren CW, Harley PJ y Woodcock B** (1984). The origin of platelet count and volume. *Clin Phys Physiol Meas*, 5:145-170.
- Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, Crossley M y Orkin SH** (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell*, 90:109-119.
- Uhrin P, Zaujec J, Breuss JM, Olcaydu D, Chrenek P, Stockinger H, Fuerbauer E, Moser M, Haiko P, Fassler R, Alitalo K, Binder BR y Kerjaschki D** (2010). Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation. *Blood*, 115:3997-4005.
- van der Loo B y Martin JF** (1996). Platelet changes in patients with acute myocardial infarction treated with immediate PTCA. *Circulation*, 94:3001-3002.
- Vannucchi AM, Paoletti F, Linari S, Cellai C, Caporale R, Ferrini PR, Sanchez M, Migliaccio G y Migliaccio AR** (2000). Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. *Blood*, 95:2559-2568.
- Vollmar B y Menger MD** (2009). The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*, 89:1269-1339.
- Wallace PM, MacMaster JF, Rillema JR, Peng J, Burstein SA y Shoyab M** (1995). Thrombocytopoietic properties of oncostatin M. *Blood*, 86:1310-1315.
- Wang D, Villasante A, Lewis SA y Cowan NJ** (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol*, 103:1903-1910.
- Wang JF, Liu ZY y Groopman JE** (1998). The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood*, 92:756-764.
- Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncz M y Blobel GA** (2002). Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *Embo J*, 21:5225-5234.
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ y Rabbitts TH** (1994). The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell*, 78:45-57.
- Weissman IL, Papaioannou V y Gardner R** (1978). Fetal hematopoietic origins of the adult hemolymphoid system. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, 5: Differentiation of Normal and Neoplastic Hematopoietic Cells:33-47.
- Weyrich AS, Lindemann S y Zimmerman GA** (2003). The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*, 1:1897-1905.
- Weyrich AS y Zimmerman GA** (2004). Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*, 25:489-495.

- Wilcox JN y Derynck R** (1988). Developmental expression of transforming growth factors alpha and beta in mouse fetus. *Mol Cell Biol*, 8:3415-3422.
- Wilson ME, Scheel D y German MS** (2003). Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev*, 120:65-80.
- Wright JE** (1906). The origin and nature of the blood platelets. *Boston Medic. Surg. J.*, 154:643-645.
- Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, Ebihara Y, Manabe A, Tanaka R, Eguchi M, Asano S, Nakahata T y Tsuji K** (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, 97:2016-2022.
- Yamada E** (1957). The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*, 29:267-290.
- Yamamoto C, Yagi S, Hori T, Iida T, Taniguchi K, Isaji S y Uemoto S** (2010). Significance of portal venous VEGF during liver regeneration after hepatectomy. *J Surg Res*, 159:e37-43.
- Yoder MC, Hiatt K y Mukherjee P** (1997). In vivo repopulating hematopoietic stem cells are present in the murine yolk sac at day 9.0 postcoitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94:6776-6780.
- Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y y Li L** (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425:836-841.
- Zhu J y Emerson SG** (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene*, 21:3295-3313.
- Zimmet J y Ravid K** (2000). Polyploidy: occurrence in nature, mechanisms, and significance for the megakaryocyte-platelet system. *Exp Hematol*, 28:3-16.
- Zucker-Franklin D y Philipp CS** (2000). Platelet production in the pulmonary capillary bed: new ultrastructural evidence for an old concept. *Am J Pathol*, 157:69-74.

ANEXO I.- MATERIAL SUPLEMENTARIO

ANEXO I.- MATERIAL SUPLEMENTARIO

VÍDEO R-1.- Las células WL son altamente móviles. Se observa un cultivo de células de FL11.5 sin purificar, a las 24 horas de cultivo. Se objetiva una célula WL que se mueve a gran velocidad y que co-existe con células portadoras de proPTs. Duración captura: 1 hora. Duración vídeo: 6 segundos.

VÍDEO R-1B.- Aparición de una célula WL. Se observa un cultivo de células $CD49^Hc\text{-Kit}^D CD45^-$ de FL11.5 a las 24 horas. Se muestra la transformación de una célula esférica en una célula WL. Duración captura: 12 horas. Duración vídeo: 1 minuto y 30 segundos.

VÍDEO R-2.- Las células WL dan lugar a células con emisión de proPTs. Se muestra un cultivo de células $CD49^Hc\text{-Kit}^D CD45^-$ de FL11.5 a las 36 horas. Se objetiva cómo una célula WL se transforma en una célula formadora de proPTs. Comienzo grabación: 36 horas. Final grabación: 48 horas. Duración vídeo: 46 segundos.

VÍDEOS R-3 y R-4.- Las células del FL11.5 $CD41^+$ *in vivo* emiten proPTs. Reconstrucciones 3D de secciones tisulares de FL11.5 teñidas con el anticuerpo anti-CD41 (verde). Las tomas se han realizado en un microscopio confocal con un objetivo de 100x. Nótese la presencia de proPTs y del característico DMS.

Esquema temporal de los vídeos presentados:

